

AUS DEM PATHOLOGISCHEN INSTITUT DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktor: Prof. Dr. M. Eder

ZELLZYKLUSABHÄNGIGE INITIATION VON ADENOSINTRIPHOSPHATASE-
DEFIZIENTEN PRAE NEOPLASTISCHEN ZELLPULATIONEN IN DER
REGENERIERENDEN RATTENLEBER

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin an der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Ludwig Müller
aus Malgersdorf

München 1985

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Hartmut Rabes

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Max Eder

Dekan: Prof. Dr. med. Wolfgang Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 28. Mai 1985

Herrn Prof. Dr. H. Rabes danke ich für Themenstellung, Anleitung und Beratung bei dieser Arbeit.

Frau Dr. Schuster, Herrn Dr. Hartmann, Herrn Dr. Forek, Frau Rode, Frau Metzger, Frau Wendt und Frau Sickert danke ich für ihre Unterstützung.

Die Untersuchungen wurden mit finanzieller Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

A B K Ü R Z U N G E N

2-AAF	2-Acetylaminofluoren
ATPase	Adenosintriphosphatase
DÄNA	Diäthylnitrosamin
DMAX	maximaler Durchmesser
EDB	Enzymdefektbezirk
FUdR	Fluordesoxyuridin
HU	Hydroxyharnstoff
MNU	Methylnitrosoharnstoff
PH	partielle Hepatektomie

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. MATERIAL UND METHODE	9
2.1 Versuchsbeschreibung	9
2.2 Versuchstiere	12
2.3 Partielle Hepatektomie (PH)	12
2.4 Hydroxyharnstoff (HU)-Applikation	13
2.5 Injektion von Methylnitrosoharnstoff (MNU)	14
2.6 Diäthylnitrosamin (DÄNA)-Dauerfütterung	14
2.7 Dauerfütterung von Phenobarbital	15
2.8 Anfertigung der Kryostatschnitte	15
2.9 Enzymhistochemische Färbemethode	16
2.10 Auswertung	17
2.11 Statistik	20
3. ERGEBNISSE	21
3.1 Anzahl der EDB/cm ²	21
3.2 Prozentualer Flächenanteil der Enzymdefekt- bezirke an der untersuchten Gesamtfläche	24
3.3 Korrelation zwischen der Anzahl der EDB/cm ² und ihrem relativen Flächenanteil	27
3.4 Durchschnittliche Fläche der einzelnen ATPase-Defektbezirke	27
3.5 Relative Größenverteilung der EDB in den einzelnen Gruppen	31
3.6 Doppelklassierung in den einzelnen Gruppen	35
3.7 Korrelation zwischen der Fläche eines EDB und seinem maximalen Durchmesser	40

4.	DISKUSSION	41
5.	ZUSAMMENFASSUNG	51
6.	ANHANG	55
6.1	Auswertung der Enzymdefektbezirke	55
6.2	Eichung des Mikroskops und Bestimmung des Vergrößerungsfaktors	56
6.3	Bestimmung der Gesamtpräparatefläche	58
6.4	Beschreibung der Anfertigung der Histogramme durch den Computer	58
6.5	Beschreibung der Anfertigung des Doppel- klassenhistogramms durch den Computer	62
6.6	Statistische Berechnungen mit Hilfe des Computersystems	64
7.	LITERATURVERZEICHNIS	69

LEBENS LAUF

=====

1. EINLEITUNG

=====

Der Zusammenhang zwischen Proliferation und Carcinogenese ist schon seit Virchow bekannt. Carcinogene Substanzen zeigen eine verstärkte Wirkung an Geweben mit erhöhter Zellteilung (Warwick 1971), z.B. während der Embryogenese (Rajewsky 1972).

Zur genauen Untersuchung über proliferative Vorgänge in der Initialphase der Carcinogenese eignet sich als Modell die Rattenleber besonders gut. Im Ruhezustand befinden sich nur 0,1 % der Hepatozyten in der DNA-Synthese (Rabes 1969). Nach einer partiellen Hepatektomie (Higgins and Anderson 1931) treten die Hepatozyten in einer intralobulär determinierten Staffellung (Rabes und Tuczek 1970) in den Zellzyklus ein. 24 h nach partieller Hepatektomie sind etwa 25 % der Hepatozyten gleichzeitig in der DNA-Synthese (Rabes und Brändle 1969).

Craddock (1971) erzeugte durch eine einmalige i.p. Injektion von Dimethylnitrosamin 24 h nach partieller Hepatektomie signifikant mehr Lebertumoren als zu anderen Zeitpunkten. Die Lebertumorinzidenz ist entscheidend davon abhängig, daß das Carcinogen die Hepatozyten während der DNA-Synthesephase erreicht (Craddock and Frei 1974; Fridmann-Manduzio et al. 1977; Kaufmann 1979).

Nachteil dieser Untersuchungen ist die unterschiedliche Zellzykluskompartimentierung der Hepatozyten in verschiedenen Zeitabschnitten nach partieller Hepatektomie (Rabes et al. 1976). Bis 15 Stunden nach der Operation sind die Zellen alle noch in G₁, anschließend überschneiden sich die einzelnen Zellzyklusphasen.

Durch Synchronisation der Zellproliferation werden die Voraussetzungen für eine exakte quantitative Analyse der Carcinogensensitivität der einzelnen Zellzyklusphasen und deren Unterabschnitte geschaffen. In vitro findet man an synchronisierten Zellkulturen bei Exposition gegenüber Nitrosoguanidin erhöhte Transformationssensitivität in der späten G_1 -Phase und am G_1 S Übergang (Bertram and Heidelberger 1974). Mit anderen Carcinogenen wurde eine erhöhte Transformationsfrequenz in der frühen S-Phase nachgewiesen (Jones et al. 1976).

Hydroxyharnstoff blockiert die DNA-Synthese dosisabhängig und reversibel (Moran und Straus 1979). Ockey and Allen (1975) zeigten, daß Hydroxyharnstoff die Aktivität der Ribonucleosiddiphosphatreductase hemmt, welche für die Bildung der Desoxynucleosidtriphosphate notwendig ist.

Eine Dauerinfusion von Hydroxyharnstoff nach partieller Hepatektomie führt zur Akkumulation nahezu der gesamten Wachstumsfraktion der Leber an der G_1 S-Grenze (Rabes et al. 1977). Nach Aufhebung des Blockes treten die Hepatozyten synchron in die S-Phase ein. Im 3H -Thymidin-Autoradiogramm sind 4 Stunden nach Blockende etwa 80 % der Hepatozyten markiert.

Als initiierendes Carcinogen wurde in dieser Arbeit Methylnitrosaharnstoff (MNU) verwendet. MNU ist bei physiologischem pH sehr instabil (Druckrey et al. 1964) und bedarf keiner enzymatischen Aktivierung, um als Carcinogen wirksam zu sein. Dies bedingt die kurze Halbwertszeit von 7 Minuten (Swann and Magee 1968). Deshalb eignet sich die Substanz besonders dazu, die Sensitivität einer bestimmten Zellzyklusphase exakt zu ermitteln.

Das Carcinogen Diäthylnitrosamin (DÄNA) wird dagegen erst nach Metabolisierung in der Leber aktiv. Es erfolgt eine Dealkylierung durch mischfunktionelle Oxygenasen (Miller and Miller 1974;

Magee et al. 1975). DNA zeichnet sich durch leichte Wasserlöslichkeit aus und ist für quantitative Versuche zum Studium von Dosis-Wirkungsbeziehungen geeignet (Druckrey et al. 1961; Druckrey et al. 1967).

Das aus beiden Verbindungen entstehende ultimale Carcinogen (Methyl- bzw. Äthylkation) führt zur Alkylierung nukleophiler Positionen zellulärer Makromoleküle, neben anderen auch der DNA. Hauptalkylierungsprodukt ist das N-7 des Guanin (Magee et al. 1975), doch hat die Bildung von O⁶-Methylguanin größere Bedeutung als promutagene Läsion (Loveless 1969), da dies zur GC-AT Transitionsmutation und Fehlern bei der Transkription führen kann (Gerchmann and Ludlum 1973; Mehta and Ludlum 1978; Singer 1979; Abbott and Saffhill 1979; Nagata et al. 1982). Nicht nur die absolute Höhe an O⁶-Alkylguanin, sondern auch seine Persistenz spielen für den Prozess der malignen Transformation eine große Rolle (Goth and Rajewsky 1974; Kleihues and Margison 1974; Lewis and Swenberg 1980). Durch Fixation der promutagenen Läsion im Genom ist die Initiation auf molekularbiologischer Ebene vollzogen (Rabes 1979).

Die zwischen der Initiation maligner Tumoren und ihrer makroskopischen Manifestierung liegende Latenzzeit ist in vivo nur unter Schwierigkeiten zugänglich. Die Rattenleber bietet den Vorteil, daß die Stadien der Präneoplasie durch verschiedene Methoden sichtbar gemacht werden können. Unter Präneoplasie versteht man Gewebsveränderungen, die selbst noch keinen offensichtlichen neoplastischen Charakter tragen, die jedoch schon erkennen lassen, daß sie mit großer Wahrscheinlichkeit in eine gut- oder bösartige Geschwulst übergehen werden.

Während der Latenzzeit wurden von Gössner und Friedrich-Freksha (1964) in Ratten nach Nitrosaminbehandlung Leberzellgruppen (Foci) beobachtet, in denen die Aktivität der Glucose-6-Phosphatase vermindert war. Für quantitative Auswertungen erwiesen sich



Defektbezirke der Adenosin-triphosphatase (ATPase) als geeignet (Schauer und Kunze 1968; Rabes et al. 1972; Schieferstein et al. 1974; Scherer and Emmelot 1975). Außerdem zeichnen sich diese Foci durch mangelnde Eisenspeicherung (Williams and Yamamoto 1972; Williams 1980), Erhöhung der gamma-Glutamyltransferase (Cameron et al. 1978), Verminderung der Aktivität an Nucleasen (Taper et al. 1971) sowie durch weitere positive und negative Abberationen aus (Übersichten bei Pitot und Sirica 1980; Farber 1980; Emmelot und Scherer 1980; Bannasch et al. 1980).

Man nimmt an, daß Enzymdefektbezirke einen präneoplastischen Charakter besitzen und Stadien unterschiedlicher Expression im Prozess der malignen Transformation darstellen (Rabes 1979). Dies geht aus folgenden Tatsachen hervor:

1. EDB lassen sich oft bis zur Entstehung von Carcinomen in den verschiedenen Organen verfolgen (Schauer und Kunze 1968; Friedrich-Frekxa et al. 1969; Williams 1980)
2. Carcinome zeigen oft ähnliche Enzymaberrationen (Williams und Yamamoto 1972; Cameron et al. 1978)
3. Anzahl und Größe der EDB stehen in direkter Korrelation zur Wahrscheinlichkeit der Entstehung von hepatozellulären Carcinomen (Rabes et al. 1972)

Bei den Enzymdefektbezirken ist aufgrund vieler Kriterien zwischen Früh- und Spätstadien zu unterscheiden. In späteren Stadien findet man im Vergleich zu früheren Stadien unter anderem:

- eine Erhöhung der Proliferationsrate in den Enzymdefektbezirken (Rabes et al. 1970; Pugh and Goldfarb 1978; Rabes and Szymkowiak 1979; Barbason and Betz 1981)
- eine Zunahme der Anzahl der Enzymdefektbezirke (Rabes et al. 1972)
- eine Zunahme der mittleren Größe der Enzymdefektbezirke (Rabes et al. 1972; Pugh and Goldfarb 1978)

- einen fehlenden Proliferationsanstieg der Enzymdefektbezirke nach partieller Hepatektomie (Rabes et al. 1970; Rabes und Szymkowiak 1979)
- ein immer breiter werdendes Spektrum an Enzymaberrationen (Pugh and Goldfarb 1978; Ogawa et al. 1980)
- eine erhöhte Basophilie (Bannasch and Müller 1964)
- eine Glykogenreduktion (Bannasch and Müller 1964; Bannasch et al. 1980)
- einen Wiederanstieg der Aktivität der Beta-Glucuronidase und Serin-Dehydratase (Kitagawa 1976) sowie eine gesteigerte Induzierbarkeit der Serin-Dehydratase (Kitagawa and Pitot 1975)
- eine 100 % Koinzidenz von Bezirken mit Defekten der Glucose-6-Phosphatase und ATPase (Schieferstein et al. 1974)
- das Vorhandensein von alpha-Fetoprotein (Koen et al. 1983)

Das Wachstum der EDB kann durch verschiedene Faktoren promoviert werden, so z.B. durch Dauerfütterung von Phenobarbital.

Phenobarbital ist als Promotor der chemisch initiierten Lebercarcinogenese bei Ratten bekannt. Nach kurzdauernder Behandlung mit einem Lebercarcinogen erhöht die anschließende Dauerfütterung von Phenobarbital die Tumorinzidenz (Peraino et al. 1971; 1973; Watanabe and Williams 1978; Kitagawa et al. 1979)

Über den Mechanismus der promovierenden Wirkung von Phenobarbital gibt es verschiedene Ansichten. Peraino et al. (1971) und Tuzcek et al. (1975) berichten, daß Phenobarbital in der Leber nur eine vorübergehende und relativ geringe Erhöhung der Proliferation bewirkt. Andere Autoren sind der Meinung, daß Phenobarbital zu einer dauernden Proliferationssteigerung führt. Dies zeigt sich an einer Erhöhung des Lebergewichts (Pitot and Sirica 1980). Als Ergebnis einer Kombination von Hypertrophie und Hyperplasie werten sowohl Böhm und Moser (1976) als auch

Schulte-Hermann et al. (1981) die Lebervergrößerung nach Phenobarbitalfütterung.

Obwohl durch 0,05 % Phenobarbitalfütterung über 6 Monate keine EDB erzeugt werden können (Pitot et al. 1978), so wirkt diese Substanz speziell auf initiierte Hepatozyten proliferationssteigernd (Kitagawa and Sugano 1978). Farber (1980) faßt diese Tatsache unter dem Begriff der "selektiven Stimulation" zusammen.

Auch durch eine kurzdauernde Fütterung von DÄNA in niedriger Dosierung (2 mg/kg/d) sollten in dieser Arbeit initiierte Hepatozyten promoviert werden. Eine DÄNA-Dauerfütterung führt zu einer Zunahme der basalen Proliferationsaktivität. Bei 5 mg/kg/d steigt der ³H-Thymidinmarkierungsindex von 0,33 % am 0. Tag auf 1,97 % am 40. Tag (Scholze 1972). Dies ist die Antwort auf die toxische Inaktivierung von Zellen, vorwiegend im perivenösen Lobulusbereich. Emmelot und Scherer (1980) führen an, daß die Anzahl der Parenchymzellen dabei nicht zunimmt. Die erhöhte DNA-Synthese kennzeichnet lediglich einen erhöhten Hepatozytenumsatz aufgrund der toxischen Wirkung des Carcinogens.

Das Zweistadienkonzept der Carcinogenese wurde von Berenblum ursprünglich für Tumoren der Epidermis entwickelt (1975). Es besagt unter anderem folgendes:

1. Die Initiation ist ein kurzdauernder Prozess mit Fixation im Genom
2. Die Promotion nimmt den größten Teil der Latenzperiode ein
3. Die Anzahl von Tumoren wird durch die Initiation bestimmt, die Schnelligkeit der Tumorentwicklung von der Promotion

Das von Berenblum entwickelte Zweistadienkonzept ist auch auf nicht-epidermale Gewebe übertragen worden (Peraino et al. 1977). Es bezog sich aber auch hier nur auf makroskopisch sichtbare Tumoren. In dieser Arbeit sollen die Begriffe Initiation und

Promotion für die Stadien der Präneoplasie angewendet werden. Initiation bedeutet Entstehung der EDB (Anzahl der EDB/cm²). Der Begriff Promotion besagt, daß initiierte Hepatozyten in ihrem Wachstum gefördert werden. Dies drückt sich in einer Zunahme des relativen Flächenanteils der EDB an der untersuchten Gesamtpräparatefläche und in der Zunahme der durchschnittlichen Fläche eines EDB aus.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, eine exakte quantitative Analyse der zellzyklusabhängigen Initiation der ATPase-defizienten präneoplastischen Zellpopulationen in der regenerierenden Rattenleber vorzunehmen. Außerdem sollten quantitative Untersuchungen über das Wachstumsverhalten und die Wachstumskinetik der Defektbezirke in den Frühstadien der Präneoplasie unternommen werden.

2. MATERIAL UND METHODE

=====

2.1 VERSUCHSBESCHREIBUNG

HAUPTVERSUCH

An jeweils 9 bis 10 Tieren einer Gruppe wurde eine partielle Hepatektomie (PH) vorgenommen. 14 Stunden danach bekamen die Tiere nach einer Hydroxyharnstoff(HU)-Vorinjektion eine zehnstündige HU-Dauerinfusion. Zu verschiedenen Zeitpunkten vor HU-Infusionsbeginn, während der HU-Infusion und nach Ende der HU-Infusion wurde Methylnitrosoharnstoff (MNU) appliziert (siehe Tab. 1). 48 Stunden nach partieller Hepatektomie erhielten die Tiere eine Diäthylnitrosamin(DÄNA)-Dauerfütterung über 28 Tage. 91 Tage nach partieller Hepatektomie wurden die Tiere getötet und Kryostatschnitte der Leber angefertigt. An ihnen wurde die fokale Defizienz der Adenosintriphosphatase (ATPase) untersucht.

ZUSATZVERSUCH

Ähnlich dem Hauptversuch wurde an 9 Tieren eine partielle Hepatektomie vorgenommen, an die sich eine HU-Dauerinfusion anschloß. Die MNU-Injektion erfolgte 4 Stunden nach partieller Hepatektomie sowie 1 Stunde nach Ende des HU-Blocks. Bei beiden Zusatzgruppen schloß sich eine 77tägige Dauerfütterung von Phenobarbital an.

Gruppe	PH+HU	MNH (h nach PH)						DÄNA	Pheno- barbital
		4	19.5	25	27	29	36		

HAUPTVERSUCH

A	X	X						X	
B	X		X					X	
C	X			X				X	
D	X				X			X	
E	X					X		X	
F	X						X	X	

ZUSATZVERSUCH

G	X	X							X
H	X			X					X

KONTROLLVERSUCH

I	X								
K	X							X	
L	X			X					

Tab. 1: Tabelle über den Behandlungsmodus der einzelnen Gruppen

HAUPTVERSUCH

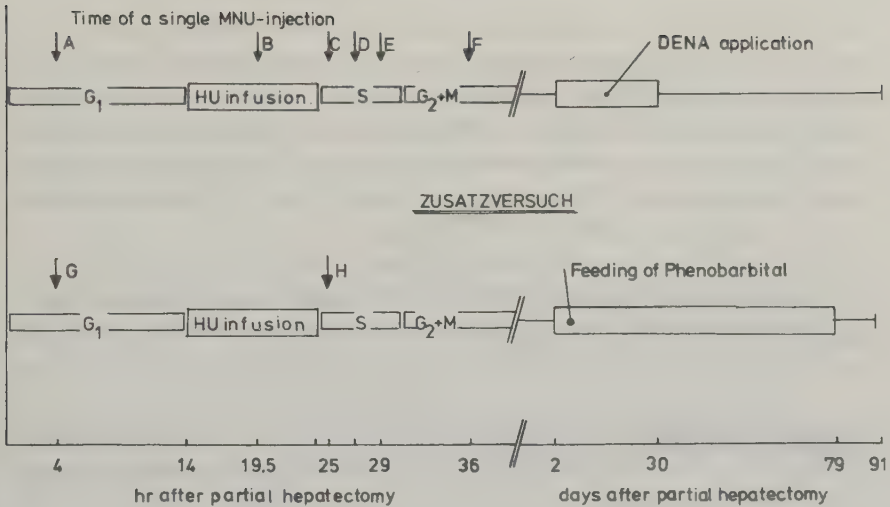


Abb. 1: Schematische Darstellung des Haupt- und Zusatzversuches.

Hauptversuch: Methylnitrosoharnstoff (MNU) wurde zu verschiedenen Zeitpunkten des Zellzyklus injiziert. Eine 28tägige Dauerfütterung von Diäthylnitrosamin in niedriger Dosierung zwischen dem 2. und 30. Tag nach partieller Hepatektomie schloß sich an. 91 Tage nach partieller Hepatektomie wurden die Tiere getötet und ATPase Defektbezirke der Leber nach enzymhistochemischer Anfärbung quantitativ ausgewertet.

Zusatzversuch: MNU-Applikation in verschiedenen Zellzyklusphasen, Dauerfütterung von Phenobarbital über 77 Tage (zwischen dem 2. und 79. Tag nach partieller Hepatektomie), Auswertung wie beim Hauptversuch

KONTROLLVERSUCH

Zur Abklärung der Versuchsergebnisse wurden Kontrollgruppen mit 8 bzw. 10 Tieren gebildet. Bei Gruppe I wurde lediglich eine partielle Hepatektomie vorgenommen, an die sich eine HU-Dauerinfusion anschloß. Bei Gruppe K erfolgte eine partielle Hepatektomie, HU-Infusion und DANA-Dauerfütterung, bei Gruppe L war der Behandlungsmodus partielle Hepatektomie, HU-Block und MNU-Injektion 1 Stunde nach Ende des HU-Blocks.

Abb. 1 gibt eine Übersicht über die Behandlung der Gruppen des Haupt- und Zusatzversuches.

2.2 VERSUCHSTIERE

Für den Versuch wurden männliche Wistar-Ratten eigener Zucht mit einem Gewicht von 195 bis 220 g verwendet. Die Tiere erhielten Altromin-R-Standard-Diät (Altromin, Lage) und Wasser ad libitum. Sie wurden in Macrolonkäfigen im klimatisierten Tierstall bei normalem Tag/Nacht-Rhythmus gehalten.

2.3 PARTIELLE HEPATEKTOMIE (PH)

Nach der Methode von Higgins und Anderson (1931) wurde unter Äthernarkose eine Zweidrittel-Hepatektomie vorgenommen. Dabei wurden der Lobus medialis und der Lobus sinistro-lateralis entfernt.

Die Tiere wurden immer in den Abendstunden (18:55 - 22:00) operiert, um circadian-bedingte Änderungen der Proliferation zu vermeiden. Sowohl Klinge und Mathyl (1969) als auch Wirsching (1974) hatten bei Hepatektomie zu verschiedenen Tageszeiten exogen bedingte Schwankungen festgestellt.

2.4 HYDROXYHARNSTOFF (HU)-APPLIKATION

Das Anlegen der HU-Dauerinfusion (Hydroxyharnstoff, reinst, Fa. Serva, Feinbiochemica, Heidelberg) erfolgte 14 Stunden nach partieller Hepatektomie. Vorher wurden die Tiere gewogen (Gewicht zwischen 180 und 210 g), um die richtige Dosierung von HU ermitteln zu können.

Nach Freilegen und Kanülieren der Schwanzvene (Technik bei Iseler (1977)) erhielt jedes Tier eine einmalige Vorinjektion von 1,69 mmol HU/kg, welcher kurz vorher in physiologischer Kochsalzlösung aufgelöst worden war.

Darauf erfolgte eine zehnstündige Dauerinfusion (Perfusor IV, Venofix cannula Nr. 72500; Fa. Braun, Melsungen) mit einer Dosis von 1,25 mmol HU/kg/h.

Während der HU-Dauerinfusion waren die Tiere in Macrolon-Einzelkäfigen untergebracht und hatten Zugang zu Wasser und Futter.

Bei einer Dosierung von 1,25 mmol/kg/h findet noch eine geringe Restsynthese der DNA statt (Rabes et al. 1977), und eine Infusionsdauer von 10 h ist viel zu kurz, um alle proliferierenden Hepatozyten an der G_1S -Grenze zu stoppen. Dennoch wurde auf höhere Dosen und längere Infusionszeiten verzichtet, um die additive Toxizität von HU und MNU auf Wechselgewebe z.B. Darmepithel (Philips et al. 1967) möglichst niedrig zu halten. Riess hatte 1978 nach 22stündiger HU-Infusion (1,875 mmol/kg/h) bei Gabe von MNU in einer Dosierung von 25 mg/kg (wie in dieser Arbeit) eine Überlebensrate der Tiere von nur 13 % festgestellt.

2.5 INJEKTION VON METHYLNITROSOHARNSTOFF (MNU)

Zu verschiedenen Zeitpunkten des Zellzyklus wurde den Tieren Methylnitrosoharnstoff (Ferak, Berlin) in einer Konzentration von 25 mg/kg intraperitoneal injiziert. Das Tiergewicht vor der Injektion variierte zwischen 177 und 210 g.

Das Carcinogen wurde kurz vor der Injektion in Mc Ilvaine Puffer (37,4 ml Zitronensäure 0,1 molar, 62,6 ml Dinatriumphosphat 0,2 molar), pH 6,0 gelöst.

Die Injektion erfolgte in der Regel ohne Narkose. Lediglich bei Injektion während des HU-Blocks mußten die Tiere narkotisiert werden, um ein Verschieben der HU-Infusionskanüle zu vermeiden.

2.6 DIÄTHYLNITROSAMIN (DÄNA)-DAUERFÜTTERUNG

Unmittelbar nach Durchführung des bisher beschriebenen Versuchsprogrammes wurden die Tiere in den klimatisierten Tierstall zurückgebracht. Dort erhielten sie nach einem Intervall von 48 Stunden nach partieller Hepatektomie zusätzlich zur Standarddiät DÄNA (Merck, Darmstadt) im Trinkwasser in einer Dosierung von 2 mg/kg und Tag.

Diese relativ niedrige Dosierung wurde gewählt, um die Initiationswirkung von Diäthylnitrosamin möglichst gering zu halten. Die DÄNA-Dauerfütterung sollte in erster Linie Schäden, die durch Methylnitrosoharnstoff initiiert wurden, promovieren.

Die DÄNA-Dauerfütterung erstreckte sich über 28 Tage. Die DÄNA-Gabe erfolgte hierbei einmal pro Woche zu einer individuell entsprechend dem Tiergewicht eingestellten Trinkwassermenge. Die Trinkflaschen waren mit einer Lichtschutzhülle umgeben, um einen Zerfall des Carcinogens zu verhindern.

2.7 DAUERFÜTTERUNG VON PHENOBARBITAL

Die Tiere der Gruppen G und H erhielten ab dem 2. Tag nach partieller Hepatektomie eine Dauerfütterung von Phenobarbital (Fluka, Neu-Ulm). Das Medikament wurde in einer Dosierung von 0,05 % von der Firma Lage zur Standarddiät gemischt. Zusätzlich erhielten die Tiere Wasser ad libitum. Die Dauerfütterung erstreckte sich über 77 Tage. Bis zum Tötungszeitpunkt nach 91 Tagen erhielten die Tiere normale Standarddiät. Phenobarbital wurde 14 Tage vor dem Tötungszeitpunkt abgesetzt, um störende Einflüsse dieses Pharmakons auf die Anfärbung der ATPase-Präparate zu vermeiden.

2.8 ANFERTIGUNG DER KRYOSTATSCHNITTE

91 $\pm$ 5 Tage nach partieller Hepatektomie wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet.

Aus jeder Leber wurden sieben Gewebestücke entnommen, und zwar aus dem Lobus dexter lateralis nach dessen Durchtrennung in horizontaler Richtung zwei Stücke aus dem kaudalen und ein Stück aus dem cranialen Anteil, aus dem Processus caudatus zwei Stücke und aus dem Processus papillaris aus jedem der beiden anatomisch vorgegebenen Anteile ein Stück. Sofort nach Entnahme wurden die Stücke mittels Kohlendioxidschnee eingefroren.

Aus jedem Leberstück wurden jeweils vier 6 μ dicke Kryostat-schnitte angefertigt. Der Abstand zwischen den Schnitten betrug mindestens 200 μ .

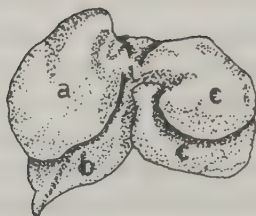


Abb. 2: Regenerierte Rattenleber nach Zweidrittel-Hepatektomie. Darstellung von ventral nach Isolierung aus dem Tier. Zeichnung aus Hartmann (1981)

Zur Anfertigung der Kryostatschnitte wurden aus dem Lobus dexter lateralis (a) drei Stücke, aus dem Processus caudatus (b) zwei und aus jedem Processus papillaris (c) ein Stück entnommen.

2.9 ENZYMHISTOCHEMISCHE FÄRBEMETHODE

Die Aktivität der Adenosintriphosphatase (ATPase) wurde mit der modifizierten Methodik von Wachstein und Meisel (1957) nachgewiesen.

Das Substrat (Adenosin-5'-triphosphat, Fa. Boehringer, Mannheim) wurde in Aqua bidest. gelöst, mit einer Lösung aus 0,2 M Tris-Maleat-Puffer (pH 7,5), 0,1 M Magnesium-Sulfat, 2 % Bleinitrat und Aqua bidest. gemischt, filtriert und auf 37 °C angewärmt.

Die Präparate wurden 30 Minuten bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die Glasbehälter waren vorgewärmt. Nach Wässerung wurden die Schnitte für 15 s in H₂S entwickelt und nach einer weiteren

Wässerung in 10 % Formol fixiert. Nach anschließender Wässerung und Trocknung erfolgte eine Eindeckung mit Glyceringelatine.

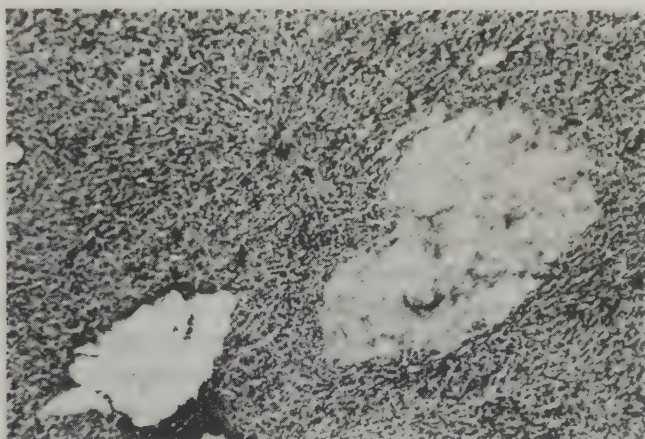


Abb. 3: ATPase Defektbezirk nach Anfärbung mit der Methode von Wachstein und Meisel (1957). Versuchsgruppe C. (Vergr. 100 x). Anzahl und relativer Flächenanteil klar abgrenzbarer Defektbezirke wurden quantitativ ausgewertet. Links unten ist ein Gefäß dargestellt.

2.10 AUSWERTUNG

Die Auswertung erfolgte auf einem Videoplan Meßsystem (Fa. Kontron, München). Hierzu gehört ein Computer, in den Daten je nach eingestelltem Programm verarbeitet und gespeichert werden können, ein Meßtablett und ein Auswertestift. Das System ist mit einem Bildschirm und einem Drucker gekoppelt.

Mit dem Videoplan-System verbunden ist ein Mikroskop. Durch einen Spiegel wird die punktförmige Lichtquelle eines auf dem Meß-

tablett frei beweglichen Auswertestiftes in das Gesichtsfeld des Mikroskops projiziert.

So ergibt sich die Möglichkeit, die Enzymdefektbezirke mit dem leuchtenden Punkt auf dem Meßtablett zu umfahren und mit Hilfe von Vergrößerungsfaktoren die Parameter der Enzymdefektbezirke (Fläche, maximaler Durchmesser) zu bestimmen. Die technisch praktische Durchführung der Auswertung der EDB mit Hilfe des Computersystems ist im Anhang näher beschrieben.

Kriterium eines Enzymdefektbezirktes war der Ausfall der zytoplasmatischen und kanalikulären ATPase sowie eine scharfe Abgrenzung gegenüber den umgebenden Zellbezirken. Die Enzymdefektbezirke wurden immer an ihrem äußeren Rand umfahren. Aus Gründen der Objektivität und Reproduzierbarkeit wurden nur EDB mit einer Größe von mindestens $0,01 \text{ mm}^2$ in die Auswertung einbezogen. EDB mit einer Größe unter $0,01 \text{ mm}^2$ wurden zwar erfaßt, vom Computer bei der Auswertung aber nicht berücksichtigt.

Pugh et al. (1983) betonen die Notwendigkeit einer unteren Grenze bei der Auswertung. Diese muß hoch genug sein, damit die Untersuchungen bei verschiedenen Färbemethoden und bei verschiedenen Auswertern reproduzierbar sind. Bei Färbung mit HE (basophile hepatische Foci) genügt eine untere Grenze von $0,0046 \text{ mm}^2$.

Andere Autoren verwenden folgende untere Grenzen:

Scherer et al. 1972	Fläche $0,0025 \text{ mm}^2$
Schieferstein et al. 1974	keine untere Grenze
Hartmann 1981	Fläche $0,005 \text{ mm}^2$
Koen et al. 1983	Durchmesser $0,04 \text{ mm}$

Es fällt auf, daß die verschiedenen Autoren die untere Grenze der EDB entweder nach der Fläche oder nach dem maximalen Durchmesser definieren. Vgl. hierzu 3.7.

Zur Bestimmung der Gesamtfläche der Präparate pro Tier wurden diese einzeln in ein Projektionsgerät eingeführt und die projizierte Fläche auf Papier abgezeichnet. Die Zeichnungen wurden auf dem Meßtablett mit dem Auswertestift umfahren. Anschließend wurde unter Berücksichtigung der bei der Projektion entstandenen Vergrößerung die Gesamtfläche ermittelt (Näheres im Anhang unter 6.3).

Wie in 2.8 erwähnt, wurden pro Tier 28 Präparate angefertigt, jeweils 4 aus jedem Gewebestück. Für die Auswertung wurden die Präparate nach folgenden Kriterien ausgewählt:

1. Die Gesamtfläche pro Tier sollte mindestens 10 cm^2 betragen. Ausnahmen waren Gruppe F ($9,37 \text{ cm}^2$) und Gruppe I ($9,96 \text{ cm}^2$, $9,98 \text{ cm}^2$, $9,97 \text{ cm}^2$, $9,95 \text{ cm}^2$, $9,94 \text{ cm}^2$).
2. Die Färbung, überprüft unter dem Mikroskop bei schwacher Vergrößerung, mußte optimal sein.
3. Die Präparate wurden so ausgewählt, daß eine möglichst gleichmäßig-homogene Verteilung über die einzelnen Leberabschnitte gegeben war.
4. Der Abstand zwischen den Präparaten eines Gewebestücks mußte möglichst groß sein, um bei räumlich ausgedehnten präneoplastischen Zellpopulationen ein gleichzeitiges Auftreten auf zwei Schnitten zu vermeiden.

Als Alternative zu dieser Methode der Auswertung bietet sich an, aus jedem Leberlappen nur einen großflächigen Schnitt anzufertigen, um bei großen EDB ein gleichzeitiges Auftreten auf zwei Schnitten eines Gewebeblockes zu vermeiden.

Abschließend wurden die Präparate randomisiert, um die Objektivität der Auswertung zu erhöhen.

2.11 STATISTIK

Folgende Berechnungen wurden durchgeführt:

Mittelwert
$$\bar{X} = \frac{X_1 + X_2 + \dots + X_n}{n} ;$$

Standardabweichung
$$SD = \sqrt{\frac{(X_n - \bar{X})^2}{(n - 1)}} ;$$

Standardfehler
$$SE = \frac{SD}{\sqrt{n}} ;$$

Zur Untersuchung der Signifikanz wurde der U-Test durchgeführt (Vertrauensniveau 95 %). Automatisch war hierbei ein Kolmogoroff-Smirnow-Test eingefügt, welcher in allen Fällen negativ war.

Alle statistischen Berechnungen wurden mit dem Videoplan-Computer durchgeführt. Die genaue Beschreibung findet sich im Anhang.

3. ERGEBNISSE

3.1 ANZAHL DER EDB/cm²

Die Anzahl der EDB ist ein Maß für die Initiation (die Ergebnisse sind in Abb. 4 und Tab. 2 dargestellt). Die Anzahl der EDB ist bei Exposition gegenüber Methylnitrosoharnstoff und anschließender Wachstumsförderung in der frühen G₁-Phase sehr gering. Exposition an der G₁S-Grenze führt zu einem steilen Anstieg. Das Maximum wird in der frühen S-Phase erreicht. Bereits in der mittleren S-Phase werden deutlich weniger EDB initiiert. Die Carcinogensensitivität der späten S-Phase und der G₂-Phase liegen in der gleichen Größenordnung wie in der G₁-Phase. Die Wahrscheinlichkeit der Initiation von EDB in den Frühstadien der Carcinogenese ist nach den vorliegenden Ergebnissen auf die späte G₁-Phase und die frühe S-Phase begrenzt (vgl. Müller und Rabes 1983; Rabes 1983).

Bei der statistischen Auswertung ergaben sich für die Versuchsgruppen des Hauptversuches (PH, HU, MNU zu verschiedenen Zeitpunkten des Zellzyklus, DÄNA-Dauerfütterung) folgende Unterschiede für die Initiationssensitivität der einzelnen Zellzyklusphasen:

	B	C	D	E	F	
A	s	s	n	n	n	
B			n	n	s	s = signifikanter Unterschied
C				s	s	n = nichtsignifikanter Unterschied
D					n	
E						Signifikanzniveau: 95 %

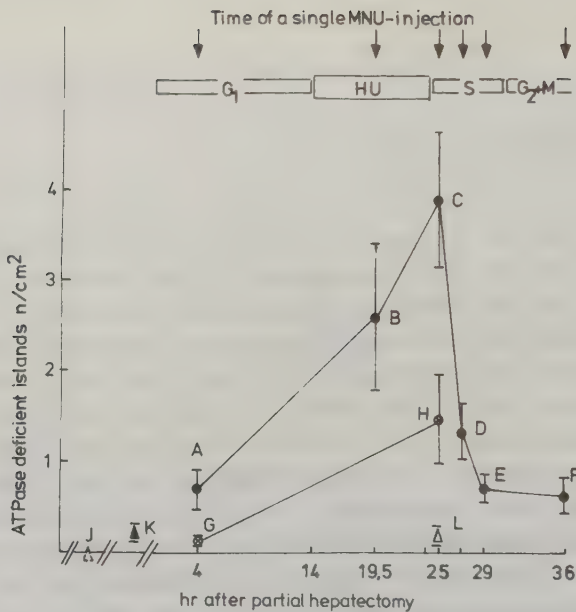


Abb. 4: Anzahl der Enzymdefektbezirke/ cm^2 .

Abszisse: Zeitpunkt¹ der Applikation des Pulscarcinogens MNU nach partieller Hepatektomie

Ordinate: Anzahl der Enzymdefektbezirke/ cm^2 (Mittelwert $\pm$ Standardfehler)

- PH, HU-Block, MNU-Injektion zu verschiedenen Zeitpunkten, DÄNA-Dauerfütterung
- ⊗ PH, HU-Block, MNU-Injektion zu verschiedenen Zeitpunkten, Dauerfütterung von Phenobarbital
- △ PH, HU-Block
- ▲ PH, HU-Block, DÄNA-Dauerfütterung
- △ PH, HU-Block, MNU-Injektion

<u>Gruppe A</u>	<u>Gruppe B</u>	<u>Gruppe C</u>	<u>Gruppe D</u>
0,34	7,26	6,56	2,58
2,37	2,48	1,28	0,00
0,37	0,89	1,79	1,57
0,81	6,46	1,78	2,30
0,35	1,84	5,59	0,72
1,04	1,58	4,45	0,59
0,95	1,21	0,49	2,45
0,69	1,58	5,84	0,69
0,00	0,16	4,27	1,20
0,00		7,00	
MW 0,69	MW 2,61	MW 3,91	MW 1,35
SE 0,22	SE 0,83	SE 0,75	SE 0,31
<u>Gruppe E</u>	<u>Gruppe F</u>	<u>Gruppe G</u>	<u>Gruppe H</u>
0,70	0,40	0,09	1,31
1,09	1,30	0,23	0,66
1,54	0,40	0,23	1,31
0,70	0,30	0,27	0,74
0,29	0,21	0,00	0,24
0,36	1,28	0,00	5,20
0,97	1,95	0,08	0,97
0,26	0,37	0,00	1,70
1,09	0,22	0,07	0,82
0,32	0,12		
MW 0,73	MW 0,65	MW 0,11	MW 1,44
SE 0,14	SE 0,20	SE 0,04	SE 0,49
<u>Gruppe I</u>	<u>Gruppe K</u>	<u>Gruppe L</u>	
0,00	0,00	0,00	
0,00	0,08	0,50	
0,00	0,00	0,07	
0,00	0,09	0,00	
0,00	0,18	0,00	
0,00	1,02	0,08	
0,00	0,35	0,54	
0,00	0,00	0,35	
	0,18		
	0,09		
MW 0,00	MW 0,20	MW 0,19	
SE 0,00	SE 0,10	SE 0,08	

Tab. 2: Anzahl der ATPase-Defektbezirke (n/cm^2) bei den einzelnen Tieren. Für jede Versuchsgruppe ist außerdem der Mittelwert ($\pm$ Standardfehler) angegeben.

Bei einem Vergleich zwischen den Tiergruppen des Zusatzversuches (PH, HU, MNU in G_1 und früher S-Phase, Dauerfütterung von Pheno-barbital) ergibt sich ein signifikanter Unterschied der Initiationssensitivität bei Exposition in der G_1 -Phase und frühen S-Phase.

3.2 PROZENTUALER FLÄCHENANTEIL DER ENZYMDEFEKTBEZIRKE AN DER UNTERSUCHTEN GESAMTFLÄCHE

Der prozentuale Flächenanteil ist ein Maß für die Promotion.

Wie für die Anzahl der EDB/cm² so gilt auch für den relativen Flächenanteil der EDB an der untersuchten Gesamtpräparatefläche, daß dieser bei Exposition gegenüber MNU in der frühen G_1 -Phase sehr gering ist und an der G_1 /S-Grenze zunimmt. Das Maximum findet sich in der frühen S-Phase. In der mittleren und späten S-Phase erfolgt ein Abfall. Der relative Flächenanteil in der G_2 -Phase liegt in der gleichen Größenordnung wie in der G_1 -Phase (Abb. 5; Tab. 3).

Vergleicht man die Tiergruppen, welche nach Methylnitrosoharnstoffinjektion 1 Stunde nach Ende des HU-Blockes mit den verschiedenen Promotoren behandelt wurden, so ergibt sich ein signifikanter Beweis für die promovierende Wirkung von Diäthyl-nitrosamin in niedriger Dosierung (Gruppe C) und Phenobarbital (Gruppe H). Gruppe L ohne Promotor!

	H	L
C	s	s
H	s	

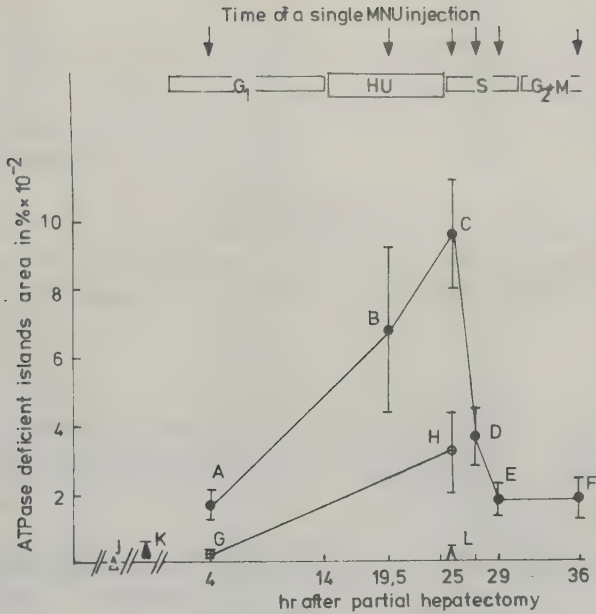


Abb. 5: Relativer Flächenanteil der ATPase Defektbezirke an der Gesamtpräparatefläche

Abszisse: Zeitpunkt der Applikation des
Pulscarcinogens MNU

Ordinate: Relativer Flächenanteil der ATPase Defekt-
bezirke an der Gesamtpräparatefläche; die in
der Abbildung dargestellten Werte sind mit
10² multipliziert.

- PH, HU-Block, MNU-Injektion zu verschiedenen Zeitpunkten, DÄNA-Dauerfütterung
- ⊗ PH, HU-Block, MNU-Injektion zu verschiedenen Zeitpunkten, Dauerfütterung von Phenobarbital
- △ PH, HU-Block
- ▲ PH, HU-Block, DÄNA-Dauerfütterung
- △ PH, HU-Block, MNU-Injektion

<u>Gruppe A</u>	<u>Gruppe B</u>	<u>Gruppe C</u>	<u>Gruppe D</u>
0,61	15,67	11,96	5,04
4,38	4,98	3,00	0,00
0,80	1,43	5,88	3,41
1,71	21,84	5,83	6,93
0,79	4,02	15,17	1,65
2,06	3,16	12,04	1,91
2,68	4,37	1,03	7,09
2,25	3,38	11,80	0,91
0,00	0,58	13,04	3,55
0,00		14,44	
MW 1,53	MW 6,60	MW 9,42	MW 3,51
SE 0,43	SE 0,24	SE 1,59	SE 0,88
<u>Gruppe E</u>	<u>Gruppe F</u>	<u>Gruppe G</u>	<u>Gruppe H</u>
1,33	0,99	0,32	2,44
1,60	5,82	0,42	1,30
3,13	0,74	0,91	2,87
1,18	0,59	0,41	1,09
0,50	0,67	0,00	0,37
0,62	2,36	0,00	14,03
2,13	4,09	0,08	1,70
0,43	0,80	0,00	2,90
5,07	0,37	0,17	1,41
0,62	0,27		
MW 1,66	MW 1,67	MW 0,26	MW 3,12
SE 0,46	SE 0,59	SE 0,10	SE 1,39
<u>Gruppe I</u>	<u>Gruppe K</u>	<u>Gruppe L</u>	
0,00	0,00	0,90	
0,00	1,42	0,90	
0,00	0,00	0,08	
0,00	0,10	0,00	
0,00	0,26	0,00	
0,00	1,62	0,11	
0,00	0,98	0,81	
0,00	0,00	0,59	
	0,47		
	0,12		
MW 0,00	MW 0,50	MW 0,31	
SE 0,00	SE 0,20	SE 0,14	

Tab. 3: Relativer Flächenanteil (%) der ATPase-Defektbezirke an der untersuchten Gesamtpräparatefläche. Dargestellt sind die Werte für jedes einzelne Tier sowie Mittelwert ($\pm$ Standardfehler) für jede Versuchstiergruppe. Die in der Tabelle angegebenen Werte sind mit 10^2 multipliziert.

3.3 KORRELATION ZWISCHEN DER ANZAHL DER EDB/cm² UND IHREM RELATIVEN FLÄCHENANTEIL

Es fällt auf, daß die Kurven für die Anzahl der EDB/cm² (3.1) und die Kurve für den relativen Flächenanteil der EDB an der untersuchten Gesamtpräparatefläche (3.2) einen weitgehend identischen Verlauf zeigen.

Werden auf einem Diagramm die Anzahl der EDB eines Versuchstieres und der relative Flächenanteil der EDB des selben Tieres dargestellt, so ergibt sich ein Korrelationskoeffizient von 0,96 (Abb. 6).

3.4 DURCHSCHNITTliche FLÄCHE DER EINZELNEN ATPase DEFECTBEZIRKE

Die durchschnittliche Fläche der einzelnen ATPase Defektbezirke ist in Abb. 7 dargestellt.

Dabei zeigt sich, daß die Zellzyklusphase der Carcinogenapplikation (Initiation) keinen Einfluß auf die spätere durchschnittliche Fläche der EDB (Promotion) hat.

Die Promotion ist bei gleichem Behandlungsmodus weitgehend konstant. Bei den Gruppen des Hauptversuches (PH, HU, MNU zu verschiedenen Zeitpunkten des Zellzyklus, DÄNA-Dauerfütterung) finden sich (mit Ausnahme der Gruppe E) keine signifikanten Unterschiede der mittleren Fläche der EDB. Auch ein Vergleich der Gruppen G und H des Zusatzversuches (PH, HU, MNU in G₁ und früher S-Phase, Dauerfütterung von Phenobarbital) zeigt keinen signifikanten Unterschied der mittleren Fläche von EDB, die in der G₁-Phase und frühen S-Phase initiiert wurden.

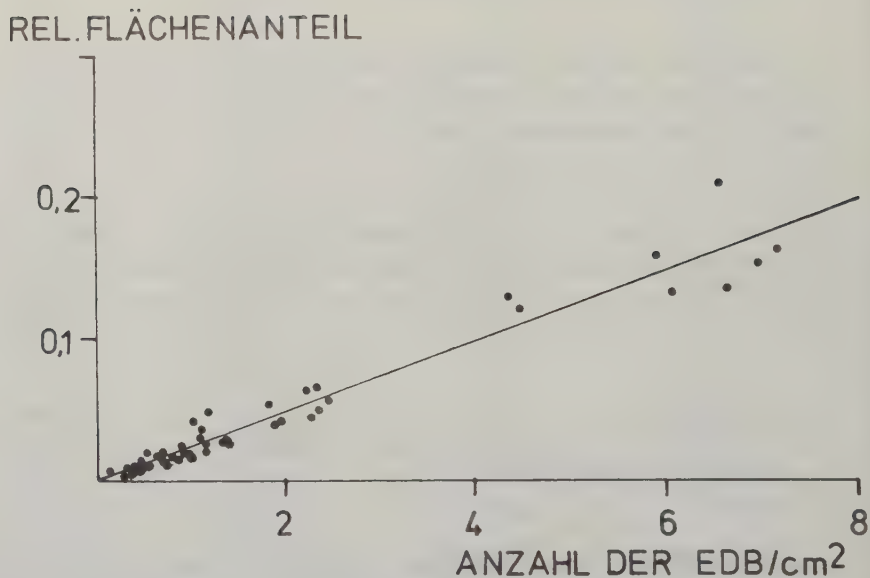


Abb. 6: Korrelation zwischen Anzahl der EDB eines Tieres und dem relativen Flächenanteil der EDB des selben Tieres, dargestellt für alle Tiere des Hauptversuches
Abszisse: Anzahl der Enzymdefektbezirke /cm²
Ordinate: Relativer Flächenanteil der EDB (%)

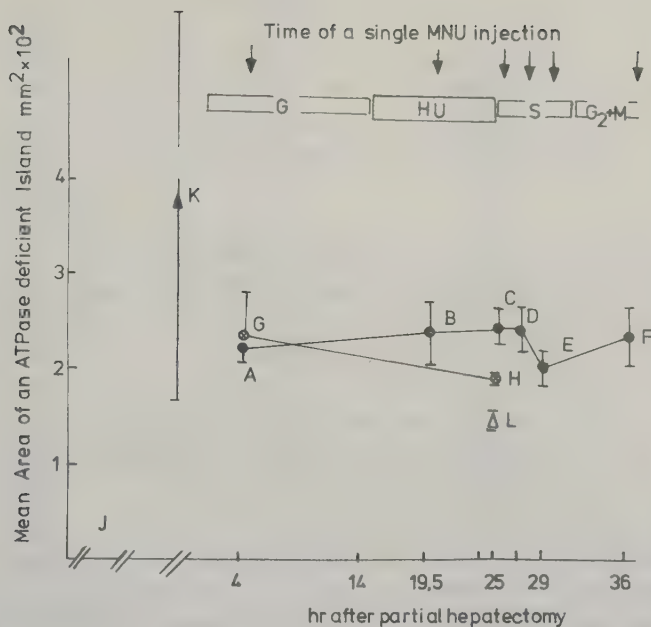


Abb. 7: Mittlere Fläche der einzelnen Enzymdefektbezirke in den verschiedenen Versuchstiergruppen

Abszisse: Zeitpunkt der Applikation des Pulscarcinogens MNU

Ordinate: Mittlere Fläche der Enzymdefektbezirke (mm^2); Zahlenangaben sind mit 10^2 multipliziert. Eingetragen sind Mittelwert ($\pm$ Standardfehler).

- PH, HU-Block, MNU-Injektion zu verschiedenen Zeitpunkten, DÄNA Dauerfütterung
- ⊗ PH, HU-Block, MNU-Injektion zu verschiedenen Zeitpunkten, Dauerfütterung von Phenobarbital
- △ PH, HU-Block
- ▲ PH, HU-Block, DÄNA Dauerfütterung
- △ PH, HU-Block, MNU-Injektion

<u>Gruppe A</u>	<u>Gruppe B</u>	<u>Gruppe C</u>	<u>Gruppe D</u>
1,78	2,16	1,82	2,34
1,85	2,01	2,34	-
2,17	1,61	3,28	2,17
2,12	3,38	3,28	3,01
2,26	2,18	2,71	2,31
1,98	2,01	2,71	3,25
2,83	3,61	2,09	2,89
3,27	2,14	2,02	1,31
-	3,58	3,05	2,97
-	-	2,06	-
MW 2,28	MW 2,52	MW 2,54	MW 2,53
SE 0,18	SE 0,26	SE 0,17	SE 0,22
<u>Gruppe E</u>	<u>Gruppe F</u>	<u>Gruppe G</u>	<u>Gruppe H</u>
1,91	2,72	3,49	1,87
1,47	4,49	1,78	1,99
2,04	1,87	3,95	2,18
1,69	1,99	1,51	1,48
1,75	3,13	-	1,55
1,72	1,84	-	2,69
2,20	2,10	1,26	1,75
1,65	2,17	-	1,70
4,64	1,70	2,41	1,73
1,89	2,26	-	-
MW 2,10	MW 2,43	MW 2,40	MW 1,89
SE 0,29	SE 0,27	SE 0,45	SE 0,12
<u>Gruppe I</u>	<u>Gruppe K</u>	<u>Gruppe L</u>	
-	-	-	
-	15,89	1,81	
-	-	1,11	
-	1,07	-	
-	1,39	-	
-	1,59	1,43	
-	2,78	1,51	
-	-	1,68	
-	2,66	-	
-	1,28	-	
MW -	MW 3,80	MW 1,51	
SE -	SE 2,03	SE 0,12	

Tab. 4: Mittlere Größe der Enzymdefektbezirke einer Versuchsgruppe. Die Zahlenangaben sind mit 10^{-2} zu multiplizieren, um den wahren Wert (mm^2) zu erhalten. Traten bei einem Versuchstier keine EDB auf, so wurde dieses Tier bei der Berechnung des Mittelwertes nicht berücksichtigt.

Durch Promotoren kann das Wachstum von Enzymdefektbezirken (Flächenzunahme) gefördert werden. So findet man bei einem Vergleich der Tiergruppen, welche 1 h nach Ende des HU-Blockes mit MNU injiziert wurden, daß sowohl die Dauerfütterung von Phenobarbital als auch die Dauerfütterung von DÄNA als Promotor zu einer signifikanten Größenzunahme der EDB im Vergleich zur Gruppe L (kein Promotor) führt.

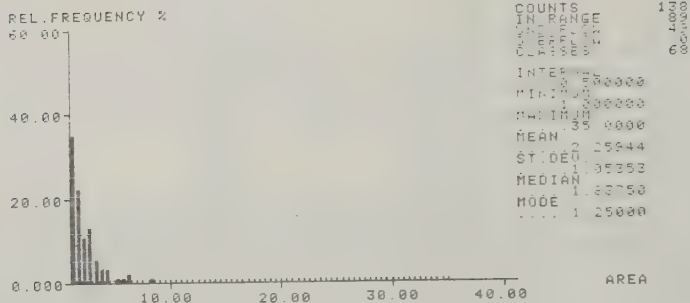
Gruppe L, die einzige Gruppe, bei der Enzymdefektbezirke zwar initiiert, aber nicht promoviert wurden, zeigt die kleinsten EDB überhaupt.

3.5 RELATIVE GRÖSSENVERTEILUNG DER EDB IN DEN EINZELNEN GRUPPEN

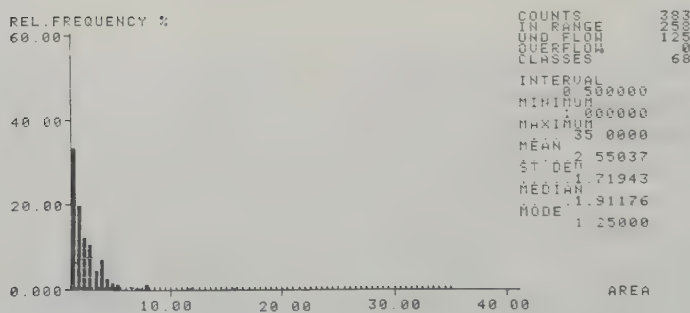
Mit Hilfe eines speziellen Computerprogrammes (siehe Anhang 6.4) wurden die Enzymdefektbezirke aller Tiere einer Versuchsgruppe verschiedenen Größenklassen zugeordnet. Das Minimum betrug $0,01 \text{ mm}^2$, das Maximum $0,35 \text{ mm}^2$, die Größe einer Klasse $0,005 \text{ mm}^2$. Auf der Abszisse sind die Begrenzungen der einzelnen Klassen eingezeichnet, auf der Ordinate ist der relative Anteil der Enzymdefektbezirke einer Klasse an der Gesamtzahl der Enzymdefektbezirke einer Gruppe eingetragen (Abb. 8). Alle Enzymdefektbezirke einer Versuchstiergruppe sind zusammengefaßt. Da es sich um relative Häufigkeitsangaben handelt, spielt die unterschiedliche Gesamtpräparatefläche einer Versuchstiergruppe nur eine untergeordnete Rolle.

Es fällt eine weitgehend homogene Größenverteilung der Enzymdefektbezirke in den einzelnen Versuchsgruppen auf. Größere Enzymdefektbezirke tauchen nur vereinzelt und ohne besondere Gesetzmäßigkeiten auf.

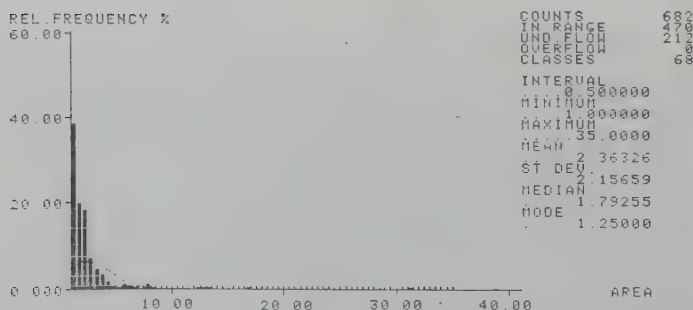
G₁-Phase: PH, HU, MNU, DÄNA



G₁S-Übergang: PH, HU, MNU, DÄNA



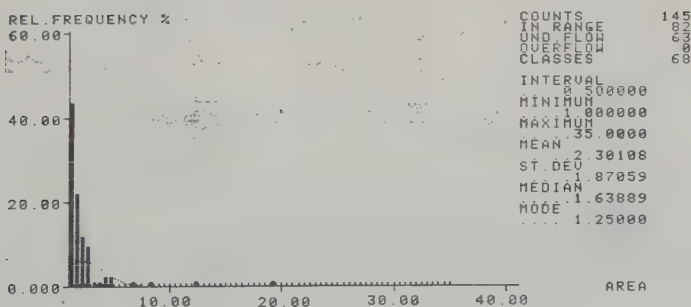
Frühe S-Phase: PH, HU, MNU, DÄNA



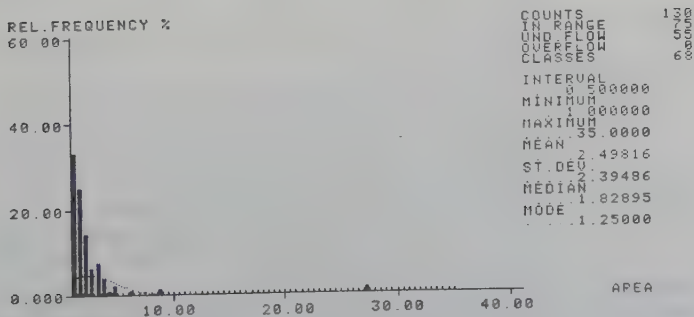
Mittlere S-Phase: PH, HU, MNU, DÄNA



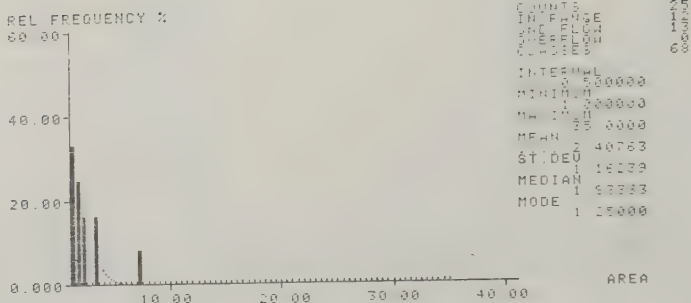
Späte S-Phase: PH, HU, MNU, DÄNA



G₂M-Phase: PH, HU, MNU, DÄNA



G₁-Phase: PH, HU, MNU, Phenobarbital



Frühe S-Phase: PH, HU, MNU, Phenobarbital

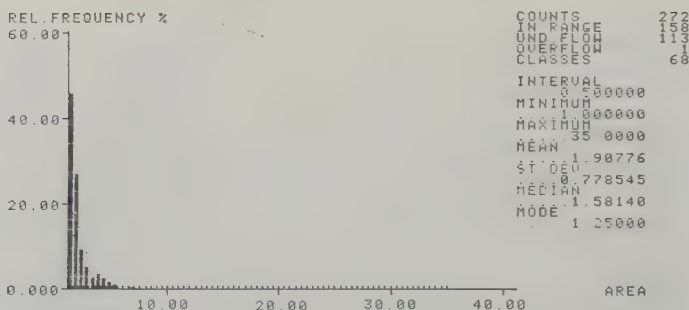


Abb. 8: Relative Größenverteilung der EDB in den einzelnen Versuchsgruppen.

Abszisse: Flächenbegrenzungen für die einzelnen EDB-Klassen (Minimum: 0,01 mm²; Maximum 0,35 mm²; Klassengröße: 0,005 mm²)

Ordinate: Relativer Anteil der EDB einer Klasse an der Gesamtzahl der EDB einer Versuchstiergruppe

Vorhergehende Doppelseite:

Versuchstiergruppen des Hauptversuchs (A, B, C, D, E, F). Behandlungsmodus: partielle Hepatektomie, HU-Block, MNU zu verschiedenen Zeitpunkten des Zellzyklus, Dauerfütterung von DANA in niedriger Dosierung

Oben: Versuchstiergruppen des Zusatzversuchs (G, H). Behandlungsmodus: PH, HU-Block, MNU-Injektion in G₁- und früher S-Phase, Dauerfütterung von Phenobarbital

Es sind alle EDB ab einer Größe von 0,01 mm² dargestellt. Nur ein EDB der Gruppe H (Größe > 0,35 mm²) wird aus technischen Gründen nicht aufgeführt.

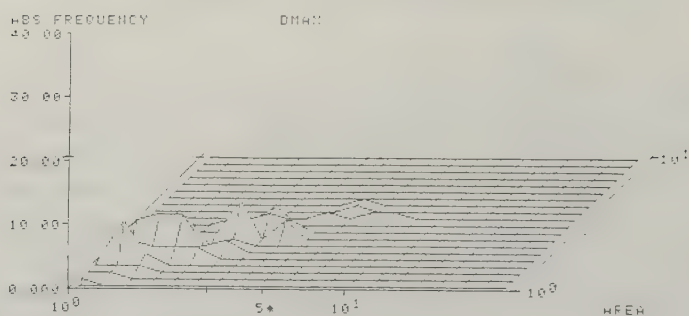
3.6 DOPPELKLASSIERUNG IN DEN EINZELNEN GRUPPEN

Mit Hilfe eines speziellen Computerprogrammes ist es möglich, zwei Parameter eines Enzymdefektbezirkes, nämlich Fläche und maximalen Durchmesser, in ihrer gegenseitigen Abhängigkeit darzustellen (ähnlich einem Scatter Diagramm). Die Werte werden hierbei klassiert (jeweils 20 Klassen), der Maßstab ist logarithmisch, die Skala reicht bei der Fläche von $0,01 \text{ mm}^2$ bis $0,4 \text{ mm}^2$, beim maximalen Durchmesser von $0,1 \text{ mm}$ bis $1,0 \text{ mm}$. Die Ordinate gibt die absolute Anzahl der EDB einer bestimmten Klasse an.

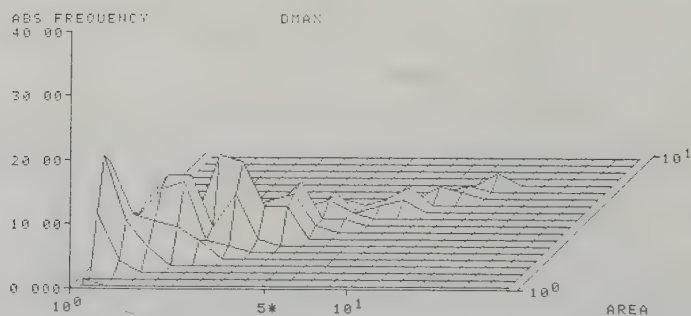
Einschränkend ist zu dieser graphischen Darstellung zu bemerken, daß die Flächensummen der ausgewerteten Präparate einer Versuchstiergruppe unterschiedlich sind. Für die Gruppen B, C, D, E, K, L, H, G und F variieren diese zwar von $109,44 \text{ cm}^2$ bis $116,72 \text{ cm}^2$ (Mittelwert $112,83 \text{ cm}^2$), die Abweichung vom Mittelwert beträgt aber nicht mehr als 3,45 %. Die Flächensumme der ausgewerteten Präparate der Gruppe I beträgt $80,06 \text{ cm}^2$, die der Gruppe A $137,39 \text{ cm}^2$.

Die nachfolgenden Diagramme sollen vor allem einen optischen Eindruck über die unterschiedliche Carcinogensensitivität der einzelnen Zellzyklusphasen vermitteln (Abb. 9).

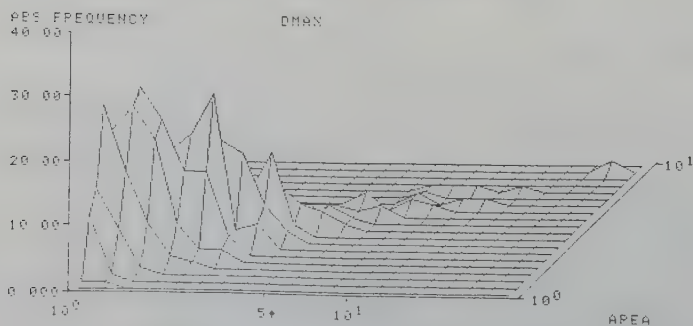
G_1 : PH, HU, MNU, DÄNA



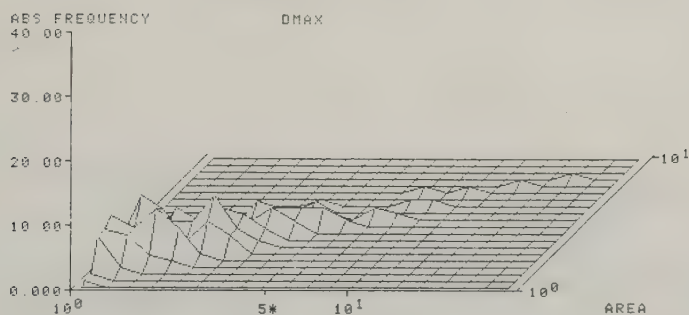
G_1 S: PH, HU, MNU, DÄNA



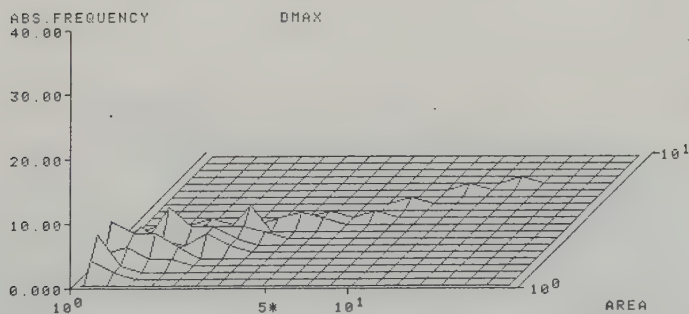
Frühe S: PH, HU, MNU, DÄNA



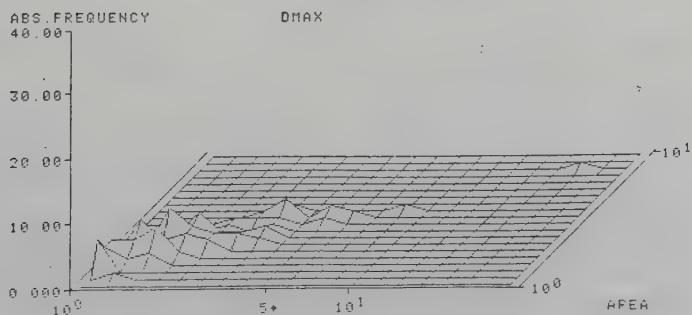
Mittlere S: PH, HU, MNU, DÄNA



Späte S: PH, HU, MNU, DÄNA



G₂M: PH, HU, MNU, DÄNA



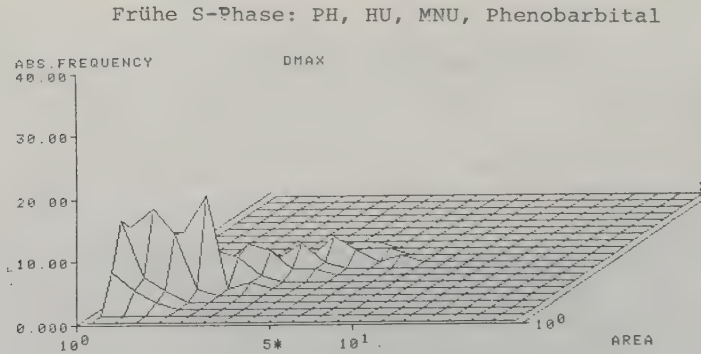
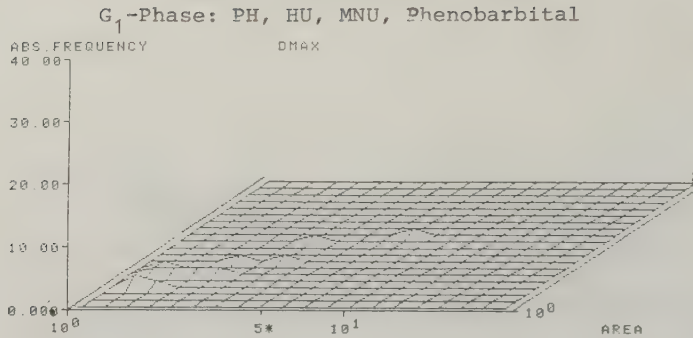


Abb. 9: Doppelklassierung in den einzelnen Versuchstiergruppen (logarithmischer Maßstab).

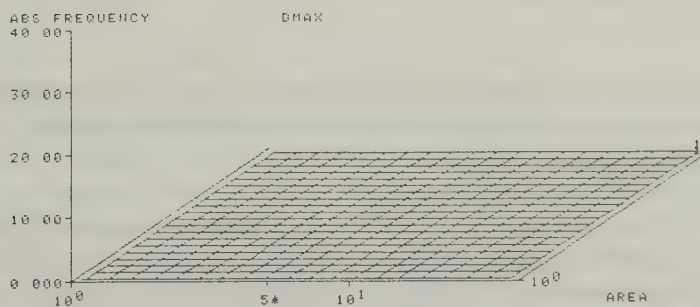
x-Achse: Fläche der EDB einer Flächenklasse; Minimum: 0,01 mm²; Maximum: 0,4 mm²; Anzahl der Klassen: 20;
 y-Achse: Maximaler Durchmesser der EDB einer bestimmten Durchmesserklasse; Minimum: 0,1 mm; Maximum: 1,0 mm; Anzahl der Klassen: 20;
 z-Achse: Absolute Anzahl der EDB einer bestimmten Flächenklasse und (maximalen) Durchmesserklasse

Vorhergehende Doppelseite: Versuchstiergruppen des Hauptversuches (A,B,C,D,E,F), Behandlungsmodus: partielle Hepatektomie, HU-Block, MNU zu verschiedenen Zeitpunkten des Zellzyklus, Dauerfütterung von DÄMA in niedriger Dosierung;

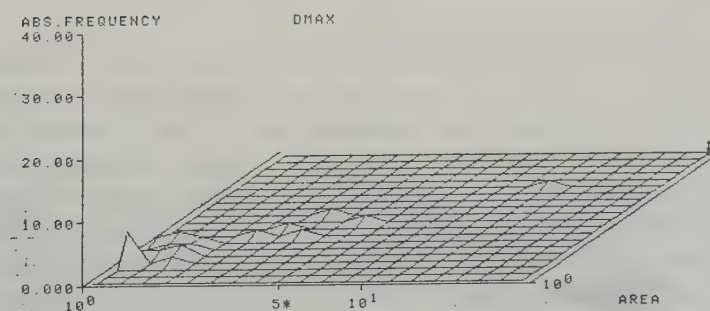
Oben: Versuchstiergruppen des Zusatzversuches (G,H): partielle Hepatektomie, HU-Block, MNU-Injektion in G₁- und früher S-Phase, Dauerfütterung von Phenobarbital

Nächste Seite: Kontrollversuch (I,K,L)

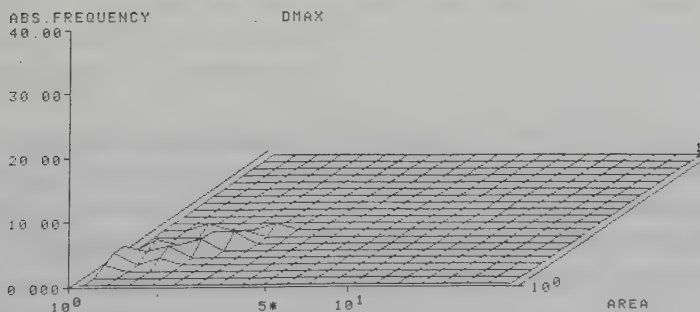
PH, HU



PH, HU, DÄNA



Frühe S: PH, HU, MNU



3.7 KORRELATION ZWISCHEN DER FLÄCHE EINES EDB UND SEINEM MAXIMALEN DURCHMESSER

Es fällt auf, daß verschiedene Autoren die untere Grenze der EDB (vgl. 2.10) entweder nach der Fläche oder nach dem maximalen Durchmesser definieren.

In Abb. 10 ist die Korrelation zwischen der Fläche eines EDB und seinem maximalen Durchmesser für alle Tiere des Hauptversuches dargestellt. Dies ermöglicht einen Vergleich zwischen den verschiedenen Autoren. Der durch den Rechner ermittelte Korrelationskoeffizient beträgt 0,88.

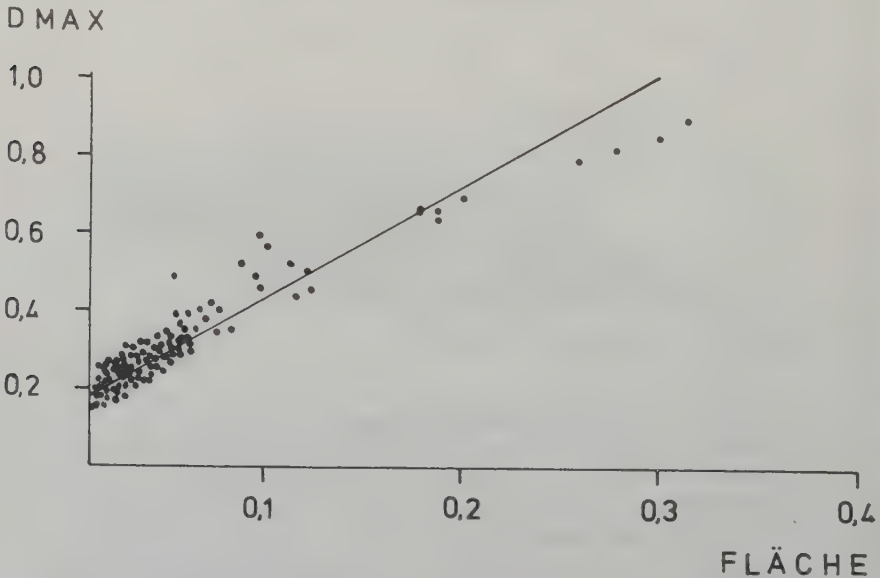


Abb. 10: Korrelation zwischen der Fläche eines EDB und seinem maximalen Durchmesser, dargestellt für alle Tiere des Hauptversuches.

Abszisse: Fläche eines EDB (mm^2); Minimum: $0,01 \text{ mm}^2$

Ordinate: Maximaler Durchmesser eines EDB (mm)

4. DISKUSSION

=====

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der zellzyklusabhängigen Initiation von ATPase-defizienten präneoplastischen Zellpopulationen in der regenerierenden Rattenleber. Bei Carcinogenexposition in der frühen G_1 -Phase ist die Anzahl der EDB sehr gering. Bei Exposition an der G_1 S-Grenze ist dieser Parameter signifikant erhöht. Exposition in der frühen S-Phase führt zu einem weiteren Anstieg. Bereits in der mittleren S-Phase fällt die Transformationssensitivität steil ab und reduziert sich weiter bei Carcinogengabe in der späten S-Phase. Die Anzahl der EDB bei Carcinogenexposition in G_2 M ist in der gleichen Größenordnung wie in der frühen G_1 -Phase.

Bisher war nur bekannt, daß sich durch partielle Hepatektomie 24 h vor einer einmaligen DÄNA-Applikation die Anzahl der ATPase-Defektbezirke auf das fünf- bis zehnfache erhöhte (Scherer et al. 1972). Falls man an teilhepatektomierten Ratten DÄNA (40 mg/kg) während der G_0 -, G_1 - oder während der synchronisierten frühen S-Phase gibt, so findet man nach 3 Monaten nur wenige EDB während der G_0 -Phase, 3,3mal so viele während der G_1 -Phase und 8,8mal so viele während der frühen S-Phase (Hartmann und Rabes 1982). Eine genaue Zuordnung der Sensitivität der einzelnen Unterabschnitte des Zellzyklus wurde bisher aber nicht durchgeführt.

Welcher Zusammenhang besteht zwischen der zellzyklusabhängigen Initiation und der Bildung und Persistenz der promutagenen Basenläsion O^6 -Methylguanin?

Wird regenerierende Rattenleber in vivo mit (14 C)-Dimethylnitrosamin alkyliert, so findet sich das Maximum an O^6 -Methylguanin während der G_1 -Phase. Die Fraktion ist niedriger während der S- und G_2 M-Phase. Der $O^6/7$ -Methylguaninquotient, den man als Maß

für die carcinogene Wirkung einer alkylierenden Substanz verwenden könnte, zeigt ähnliches Verhalten (Rabes et al. 1979). In einem weiteren Versuch (Rabes et al. 1984) fanden sich 90 sec nach intraportaler Injektion von MNU nahezu identische $O^6/7$ -Methylguaninquotienten in der G_1 - und S-Phase. Dagegen war nach 10 min der Quotient in der S-Phase signifikant stärker abgefallen als in G_1 . Da O^6 -Alkylguanin in vitro stabil ist ($T_{1/2} = 48$ h; Singer 1979), müssen Reparaturprozesse für den Verlust von O^6 -Methylguanin verantwortlich sein. Rabes et al. (1983) führten zu verschiedenen Zeitpunkten des Zellzyklus in der synchronisierten regenerierenden Rattenleber eine kontinuierliche i.v. Infusion von (^{14}C)Dimethylnitrosamin durch. Es ergab sich ebenfalls eine erhöhte O^6 -Methylguaninreparatur während der DNA-Synthese.

Weder der absolute Betrag noch die Persistenz von O^6 -Methylguanin (Rabes et al. 1982 b) dürften damit Ursache für die erhöhte Initiation von ATPase-defizienten präneoplastischen Zellpopulationen an der G_1 S-Grenze und in der frühen S-Phase sein.

Der Grund ist im speziellen Reparaturprinzip für O^6 -Methylguanin zu sehen. Kleihues und Margison (1974) äußerten ebenso wie Kirtikar und Goldthwait (1974) den Verdacht, daß die Elimination von O^6 -Methylguanin über den Mechanismus der Excision-repair funktioniert (Sneider 1974; Hanawalt et al. 1979). Pegg zeigte aber 1978, daß es sich bei dem Enzym nicht um eine N-Glycosidase handelt. Vielmehr ist eine Demethylase für die Entfernung verantwortlich. Die Entfernung von O^6 -Methylguanin erfordert, im Gegensatz zur Entfernung von 3-Methyladenin, Proteinsynthese (Huang and Stewart 1978; Warren and Lawley 1980).

Die Fähigkeit, O^6 -Methylguanin zu entfernen, ist zwar in der Leber im Vergleich zu anderen Rattengewebsextrakten besonders ausgeprägt (Pegg 1978). Auch bei anderen Spezies ist die enzymatische Entfernung von O^6 -Methylguanin in der Leber relativ hoch

(Kleihues et al. 1980; Likhachev et al. 1983). Die Reparatur wirkt aber nur bei niedrigen Carcinogendosen (Kleihues and Margison 1974; Rabes et al. 1984). Sie ist schnell erschöpfbar (Stumpf et al. 1979; Rabes et al. 1984). Die Methylgruppe wird auf einen Protein-Cystein-Rest übertragen (Pegg et al. 1982/1983). Zurück bleibt Guanin in der DNA. Es besteht eine stöchiometrische Beziehung zwischen der Produktion von S-Methylcystein und dem Verlust von O⁶-Methylguanin aus der DNA. Die Methyltransferase selbst ist Akzeptor der Methylgruppe. Jede katalytische Einheit des Enzyms kann nur eine Methylgruppe aus der DNA aufnehmen (Harris et al. 1983). Damit ist sie inaktiviert (Pegg et al. 1983). Der begrenzte Vorrat an Protein ist ein Grund für die rasche Erschöpfbarkeit der O⁶-Methylguaninreparatur. Trotz eines niedrigen Betrages an O⁶-Methylguanin und trotz initial verstärkter Reparatur entstehen aufgrund der raschen Erschöpfbarkeit des Reparaturvorganges signifikant mehr EDB während der S-Phase als zu anderen Zeitpunkten des Zellzyklus.

Bei Alkylierung in G₁ ist die Zeit bis zur nächsten DNA-Replikation ausreichend, um O⁶-Methylguanin aus der DNA zu entfernen. Bei Alkylierung während G₂ folgt keine DNA-Replikation, um die promutagene Läsion im Genom zu fixieren. Außerdem sind während der G₂-Phase die Reparaturmechanismen stark ausgeprägt.

Höhe des Betrages und Persistenz von O⁶-Methylguanin sind aber für den Initiationsprozeß weniger wichtig als die spezifische Position der Zelle im Zellzyklus (Rabes 1979; 1983).

Was ist der Grund für die besondere Sensitivität der frühen S-Phase? Von E.coli weiß man, daß Mutationen durch Nitrosoguanidin bevorzugt an der Replikationsgabel des Replicons stattfinden (Cerdeira-Olmedo et al. 1968). Falls derartige Mutationen auch in der Rattenleber vorkommen, dann bietet sich als interessante Hypothese an, daß initiationskorrelierte DNA-Sequenzen in der frühen S-Phase bevorzugt repliziert und alkyliert werden. Eine

falsche Basenpaarung (hervorgerufen durch O^6 -Methylguanin) während der frühen S-Phase führt zu einer Veränderung im Genom. Reddy et al. (1982) fanden, daß bei der Aktivierung des T24 Blasesencarcinomoncogens eine Punktmutation ($G \rightarrow T$) erfolgt ist. Dies führt zum Einbau von Valin anstelle von Glycin im entsprechenden Protein und damit zum Erwerb transformierender Eigenschaften. Tabin et al. (1982) versuchten, die genetische Läsion, die zur Aktivierung eines Oncogens führt, zu lokalisieren. Es zeigte sich, daß jeweils nur kleine Abschnitte des Genoms für den malignen Phänotyp verantwortlich sind. Gegen ein räumlich begrenztes Zusammensein von Oncogenen ("clusters") auf einem Chromosom, das in der frühen S-Phase repliziert werden könnte, sprechen die Untersuchungen von Heisterkamp et al. (1982). Hierbei zeigte sich, daß beim Menschen Homologe von viralen Oncogenen auf zwei verschiedenen Chromosomen (Nr. 15 und Nr. 9) verteilt waren.

Als Grund für die hohe Initiationssensitivität während des HU-Blockes am G_1 S-Übergang könnten folgende Faktoren diskutiert werden:

HU blockiert die DNA-Synthese nicht vollständig. Eine geringe Restsynthese findet in der regenerierenden Leber bei einer Infusion von 1,25 mmol/kg/h noch statt (Rabes et al. 1977).

Coyle und Strauss (1970) fanden bei in vitro Untersuchungen an HEp-2 Zellen, daß sich die DNA, die während des HU-Blockes im Zellkern synthetisiert wird, von normaler DNA durch ihre Größe unterscheidet (47S). Es finden sich aber in der Literatur keine Hinweise, ob besondere Vorgänge (bevorzugte Alkylierung, verlangsamte Reparatur) an der "small DNA" mit einer erhöhten Initiationssensitivität verbunden sind.

Ein weiterer Grund ist in der Initiation von Replicons während des HU-Blockes zu sehen. Amaldi et al. (1972) berichten, daß es während der DNA-Synthesehemmung durch FUDR zu einer stetigen Initiierung neuer Replicons kommt. Studien an Bakterien-Plasmid DNA ergaben, daß durch HU wohl die Kettenverlängerung von DNA verhindert wird, nicht aber die Initiation neuer Replicons an Plasmid DNA (Perlman and Rownd 1975). HU behindert nicht die Proteinsynthese (unbalanced growth; Cohen and Barner 1954; Rückert and Müller 1960; Schmidkonz 1979). Die Bereitstellung von Enzymen während des HU-Blockes führt zur Initiation von Replicons (Rajewsky 1970; Lloyd and Poole 1982).

Initiierte Replicons sind besonders störanfällig. Cerda-Olmedo et al. (1968) fanden Hinweise, daß für die Replikationsgabel eigene Gesetze im Sinne einer verstärkten Methylierung gelten. An den initiierten Replicons liegt die DNA in Einzelsträngen vor (Lewin 1980). Einzelstrang-DNA in G_1 -Zellen ist besonders störanfällig (Henson 1978). Die O^6 -Methylguanin-Transmethylase wirkt andererseits besonders an doppelsträngiger DNA (Rabes et al. 1984). Die O^6 -Methylguaninreparatur in Einzelstrang-DNA ist 100mal langsamer als an doppelsträngiger DNA (Harris et al. 1983). Dies bedingt mangelnde Reparatur der promutagenen Basenläsion O^6 -Methylguanin an den Replicons. Das Intervall bis zur nächsten S-Phase ist relativ kurz, EDB entstehen aufgrund falscher Basenpaarung in der initiationskorrelierten DNA.

In der späten S-Phase werden genausoviele EDB initiiert wie während der frühen G_1 -Phase oder während G_2M . Ein Grund hierfür könnte sein, daß die Bedeutung der promutagenen Basenläsion O^6 -Methylguanin während der späten S-Phase durch Verschiebung der Basenvorläuferpools vermindert wird. Wird in vitro ein Polymer (dC-dG) methyliert (Abbott and Saffhill 1979), dann findet man eine häufige Fehl-Inkorporation von dTMP. Dieser Einbau ist kompetitiv zum normalen Einbau von dCMP. Von Walters et al. (1973) liegen Untersuchungen über die Deoxyribonucleotid-Tri-

phosphat-Pools zu verschiedenen Zeitpunkten des Zellzyklus in CHO-Zellen vor. Sie fanden, daß der Pool an dCMP maximal in der späten S-Phase und frühen G₂-Phase ist. Dies könnte eine niedrige Initiation von EDB erklären, da der Einbau von Thymidin durch das relativ erhöhte Angebot an Cytosin verhindert wird.

Noch bis zu 40 h nach partieller Hepatektomie treten Zellen in die DNA-Synthese ein (Rabes und Tuczek 1970; Rabes 1976; Rabes et al. 1976). Nach den vorliegenden Untersuchungen findet man aber 36 h nach partieller Hepatektomie keine erhöhte Initiationssensitivität im Vergleich zu ruhenden Hepatozyten. Der Grund ist in der intralobulär determinierten Staffelung der DNA-Synthese zu sehen (Oehlert et al. 1962; Rabes und Tuczek 1970; Schmidkonz 1979). 27 h nach partieller Hepatektomie findet man eine weitgehend gleichmäßige Verteilung der DNA-Synthese über den Lobulus, nur das zentrale Fünftel ist ausgespart. Dieser Abschnitt beginnt erst später mit der DNA-Synthese, bedingt durch endogene oder mikromilieubedingte Einflüsse. Es ist anzunehmen, daß diese Einflüsse auch zu einer Veränderung der Wirkungsweise von MNU führen und daß aufgrund dieser Tatsachen (mikromilieubedingte Einflüsse - langer Anflutungsweg für MNU) nur wenig EDB initiiert werden. Als weiterer Grund könnte angenommen werden, daß perivenös lokalisierte Zellen im Lobulus eine verringerte Clonogenität aufweisen und daher nicht zu Ursprungszellen eines präneoplastischen Clones (Rabes et al. 1982) werden können.

In dem hier untersuchten Zeitpunkt befinden sich die initiierten ATPase-Defektbezirke noch in einem Frühstadium der Präneoplasie. Dies geht aus folgenden Tatsachen hervor:

1. Die relative Größenverteilung der Enzymdefektbezirke in den einzelnen Versuchsgruppen ist homogen. Größere EDB tauchen nur vereinzelt und ohne besondere Gesetzmäßigkeiten auf. Für

spätere Stadien der Präneoplasie ist eine inhomogene Größenverteilung mit dem verstärkten Auftreten größerer EDB typisch (Rabes et al. 1972; Scholze 1972).

2. Bei der relativen Größenverteilung der EDB findet sich das Maximum immer in der kleinsten Größenklasse. Es wachsen also noch ständig neue EDB nach. In späteren Stadien der Präneoplasie ist das Maximum der relativen Größenverteilung zu größeren EDB-Klassen hin verschoben (Scholze 1972; Rabes et al. 1972; Schieferstein et al. 1974).

In Anbetracht der verschiedenen Stadien der Präneoplasie stellt sich die Frage, ob Frühstadien der Präneoplasie auch Frühstadien der Carcinogenese sind (Scherer et al. 1972). Daß Vorsicht geboten ist, Ergebnisse aus den Frühstadien der Präneoplasie auf die Tumorzinzidenzrate zu übertragen, zeigen die Ergebnisse von Rabes (1979). Einmalige Injektion von DMN (4 mg/kg) führte an der G_1S -Grenze nicht zur Tumorentstehung, bei Injektion in der mittleren S-Phase entstanden aber Tumoren. Die Initiation von ATPase-defizienten präneoplastischen Zellpopulationen ist dagegen an der G_1S -Grenze höher als in der mittleren S-Phase.

Die relative Größenverteilung ist zwar weitgehend homogen. Dennoch zeigt sich innerhalb jeder Gruppe eine unterschiedliche Wachstumsgeschwindigkeit. Da alle Enzymdefektbezirke zum gleichen Zeitpunkt entstanden sind und da eine clonale Genese angenommen werden kann (Scherer and Hoffmann 1971; Rabes et al. 1982 a), muß angenommen werden, daß es bereits in den Frühstadien einzelne EDB mit schnellerer Wachstumsgeschwindigkeit gibt. Es ist denkbar, daß sich in diesen wenigen EDB aufgrund einer clonalen Selektion bereits Subpopulationen mit erhöhter Proliferationsrate befinden (Nodule in a nodule; Rabes et al. 1972; 1982; Scherer and Emmelot 1976). Erhöhung der Proliferation bedeutet Beschleunigung der Entwicklung in Richtung Neoplasie. Dennoch gilt, daß es während der Frühstadien der Präneoplasie keine Zellen gibt, die definitiv zu Tumorzellen werden. In den

Frühstadien der Präneoplasie sind Enzymdefektbezirke lediglich Vorläufer von präneoplastischen Zellen (Rabes et al. 1972).

Es konnte gezeigt werden, daß durch eine Dauerfütterung von DÄNA in niedriger Dosierung (2 mg/kg/d) über 28 Tage ATPase-Defektbezirke promoviert werden. Bei MNU-Injektion 1 h nach Ende des HU-Blockes betrug der relative Flächenanteil 0,31 %, die durchschnittliche Fläche 0,0151 mm². Durch DÄNA-Dauerfütterung erhöhten sich diese Werte auf jeweils 9,42 % bzw. 0,0252 mm².

Als Ursache ist folgendes zu diskutieren: Bei DÄNA-Dauerfütterung findet sich eine erhöhte Proliferation der Hepatozyten (Scholze 1972; Rajewsky 1972; Lewis and Swenberg 1982). Die Anzahl der Parenchymzellen steigt aber nicht an (Emmelot and Scherer 1980). Die erhöhte DNA-Synthese kennzeichnet einen erhöhten Hepatozytenumsatz aufgrund der toxischen Wirkung des Carcinogens und wird durch einen Feed-back-Mechanismus ausgelöst. Die Antwort könnte nun in den initiierten Hepatozyten stärker ausfallen und zum Anwachsen der ATPase-Defektbezirke führen (Rabes and Szymkowiak 1979).

Außerdem sind initiierte Hepatozyten gegen die toxische Wirkung eines Carcinogens resistent (Solt and Farber 1976; Laishes et al. 1978; Farber 1980; Roberts et al. 1983; Solt et al. 1983). Scherer und Emmelot (1980) führen folgende Gründe an:

1. Verhinderung der Penetration des Carcinogens durch die Zellmembran der initiierten Hepatozyten
2. Verminderte Blutversorgung der EDB und verminderter Antransport von Carcinogenen
3. Veränderter Spiegel der mischfunktionellen Oxydasen in den EDB. Diese Enzyme sind für die Carcinogenaktivierung notwendig.

Die Ursache der Resistenz der ATPase-Defektbezirke gegen die toxische Wirkung von DÄNA und der dadurch bedingte Wachstumsvorteil der EDB ist nicht in verminderter Aufnahmerate, sondern in mangelnder Aktivierung und unvollständigem Abbau von DÄNA in den EDB zu sehen.

Während das hydrophobe Carcinogen 2-AAF nicht in hyperplastische Knötchen aufgenommen wird, zeigt das wasserlösliche Dimethylnitrosamin normale Aufnahmerate (Farber 1980). Die Wechselwirkungen mit der DNA sind aber um 50 % vermindert. Es ist anzunehmen, daß das strukturverwandte DÄNA gleiches Verhalten zeigt.

Auch Dauerfütterung von Phenobarbital wirkt promovierend auf das Wachstum von EDB. Der relative Flächenanteil und die mittlere Größe der EDB nehmen signifikant zu. Phenobarbital wirkt speziell auf initiierte Hepatozyten promovierend (Peraino et al. 1971; Kitagawa and Sugano 1978; Farber 1980). Ob eine Proliferationssteigerung der initiierten Hepatozyten vorliegt (Schulte-Hermann et al. 1979; 1981) kann aufgrund der vorliegenden Ergebnisse nicht entschieden werden.

Bei Gruppe C ist der relative Flächenanteil der EDB an der untersuchten Gesamtpräparatefläche von allen Gruppen am größten. Trotzdem machen die präneoplastisch veränderten Zellpopulationen nur 0,09 % an der untersuchten Gesamtpräparatefläche aus. Nimmt man an, daß jeder EDB aus einem Hepatozyten entstanden ist (Clonale Genese: Scherer and Hoffmann 1971; Rabes et al. 1982 a), so wird deutlich, daß die Initiation ein relativ seltenes Ereignis ist. Nur einer unter 10^6 Hepatozyten wird initiiert (Farber 1980).

Die Initiation ist abhängig von der Position der Zelle im Zellzyklus. Die Promotion erfolgt unabhängig davon und ist trotz Initiation in verschiedenen Zellzyklusphasen weitgehend konstant. Dies ergibt sich aus folgenden Versuchsergebnissen:

1. Die Kurven für die Anzahl der EDB und ihrem relativen Flächenanteil zeigen einen weitgehend identischen Verlauf. Der Korrelationskoeffizient zwischen Anzahl der EDB und ihrem relativen Flächenanteil beträgt 0,96 für alle Tiere des Hauptversuches. Werden mehr EDB initiiert, so werden diese genauso stark promoviert wie nur wenige initiierte EDB.
2. Die mittlere Größe der EDB ist trotz Initiation in verschiedenen Zellzyklusphasen bei allen Versuchsgruppen mit gleichem Behandlungsmodus gleich. Es gibt also keinen besonderen Wachstumsvorteil von Zellen, die in einer bestimmten Zellzyklusphase initiiert wurden.
3. Die relative Größenverteilung ist bei allen Versuchsgruppen mit gleichem Behandlungsmodus gleich. Bei Promotionsvorteil von EDB, die in einer bestimmten Zellzyklusphase initiiert wurden, würden größere EDB relativ häufiger vertreten sein.

5. ZUSAMMENFASSUNG

=====

Männliche Wistar-Ratten (195-220 g) wurden partiell hepatektomiert und erhielten zur Synchronisation der in den Zellzyklus eintretenden Hepatozyten eine i.v. Dauerinfusion von Hydroxyharnstoff (1,25 mmol/kg/h) von der 14. bis zur 24. Stunde nach Teilhepatektomie. Zur Initiation der Transformation wurde das Pulscarcinogen Methylnitrosoharnstoff in einer Dosis von 25 mg/kg zellzyklusbezogen einmalig i.p. injiziert.

Als Injektionszeitpunkte wurden gewählt:

4 h nach partieller Hepatektomie -	frühe G ₁ -Phase
19,5 h nach partieller Hepatektomie -	G ₁ /S-Grenze
25 h nach partieller Hepatektomie -	frühe S-Phase
27 h nach partieller Hepatektomie -	mittlere S-Phase
29 h nach partieller Hepatektomie -	späte S-Phase
36 h nach partieller Hepatektomie -	G ₂ M-Phase

48 Stunden nach partieller Hepatektomie schloss sich eine 28tägige Dauerfütterung von Diäthylnitrosamin in niedriger Dosierung an (2 mg/kg/die).

In Zusatzversuchen wurden zwei Gruppen von Ratten mit Initiation in der frühen G₁-Phase und in der frühen S-Phase anstelle der DÄNA-Dauerfütterung für 77 Tage mit Phenobarbital als Promotor dauergefüttert.

In Kontrollversuchen erhielten die Tiere nach partieller Hepatektomie:

- nur eine Hydroxyharnstoff-Dauerinfusion
- eine Hydroxyharnstoff-Dauerinfusion mit anschließender Diäthylnitrosamin-Dauerfütterung über 28 Tage
- eine Hydroxyharnstoff-Dauerinfusion mit Methylnitrosoharnstoffinjektion in der frühen S-Phase

3 Monate nach partieller Hepatektomie wurden Leberzellpopulationen mit ATPase-Defekten quantitativ-morphometrisch nach Anzahl, relativem Flächenanteil, durchschnittlicher Fläche und weiteren Parametern in Kryostatschnitten der Leber ausgewertet.

Bei Carcinogenexposition in der frühen G_1 -Phase ist die Anzahl der Enzymdefektbezirke als Maß für die Initiation sehr gering. Bei Exposition an der G_1 S-Grenze ist die Initiation signifikant erhöht. Exposition in der frühen S-Phase führt zu einem weiteren Anstieg zu einem Maximum. Bereits in der mittleren S-Phase fällt die Initiationssensitivität steil ab und reduziert sich weiter in der späten S-Phase. Die Anzahl liegt bei Carcinogenexposition in G_2 M in der gleichen Größenordnung wie in der frühen G_1 -Phase.

Als Grund für die besondere Sensitivität der frühen S-Phase kann die Replikation von initiationskorrelierten DNA-Sequenzen während dieser Zellzyklusphase diskutiert werden.

Die hohe Initiation während des HU-Blockes (G_1 /S-Grenze) ist neben einer DNA-Restsynthese in der Initiation von Replicons mit bevorzugter Alkylierung und mangelnder Reparatur zu sehen.

Insgesamt betrachtet spielt die Position der Zelle im Zellzyklus eine größere Rolle für die Initiation von ATPase-defizienten präneoplastischen Zellpopulationen als die Bildungsrate und Persistenz von O^6 -Methylguanin.

Die durch die angegebene Versuchsanordnung erzeugten EDB befinden sich noch in einem Frühstadium der Präneoplasie. Dies geht aus folgenden Tatsachen hervor:

- die relative Größenverteilung der EDB ist weitgehend homogen.
- Das Maximum findet sich dabei immer in der kleinsten Größenklasse.

Durch eine DÄNA-Dauerfütterung über 28 Tage (2 mg/kg/d) können EDB promoviert werden. Relativer Flächenanteil und mittlere Größe nehmen zu. Ursache für die Promotion ist die Resistenz der initiierten Hepatozyten gegen die toxische Wirkung des Carcinogens.

Die Ursache für die Promotion der EDB durch Phenobarbitaldauerfütterung beruht wahrscheinlich auf einer selektiven Stimulation (Proliferationssteigerung) der initiierten Hepatozyten.

Die Initiation der EDB ist abhängig von der Position der Targetzelle im Zellzyklus. Die Promotion erfolgt unabhängig davon und ist trotz Initiation in verschiedenen Zellzyklusphasen weitgehend konstant. Dies wurde aus folgenden Tatsachen abgeleitet:

- a) Die Kurven für die Anzahl der EDB und ihren relativen Flächenanteil zeigen einen weitgehend identischen Verlauf; der Korrelationskoeffizient zwischen der Anzahl der EDB und ihrem relativen Flächenanteil beträgt 0,96 für alle Tiere des Hauptversuches
- b) Die mittlere Größe der EDB ist trotz Initiation in verschiedenen Zellzyklusphasen bei allen Versuchsgruppen mit gleichem Behandlungsmodus gleich
- c) Auch die relative Größenverteilung der EDB ist bei allen Versuchsgruppen mit gleichem Behandlungsmodus gleich.

6. ANHANG

=====

Durchführung der Auswertung mit Hilfe des Computersystems

6.1 AUSWERTUNG DER ENZYMDEFEKTBEZIRKE

Nach Einschalten sämtlicher Geräte und Einlage der Programmdiskette "Measuring Programm with Histogramm" in Drive A (rechtes Laufwerk) erscheint auf dem Bildschirm die Anzeige A>, welche auf der Tastatur durch Drücken der Tasten <Y>, <RETURN> beantwortet wird.

Aus Sicherheitsgründen empfiehlt es sich, nach Erscheinen der Meßanzeige auf dem Bildschirm stets mit dem Cursor auf dem Menuefeld das Feld PROG zu aktivieren. Auf dem Bildschirm erscheint nun das Parameterfeld. Durch entsprechende Bewegung des Cursors auf dem Meßtablett können verschiedene Parameter aktiviert werden. Normalerweise genügen AREA und DMAX.

Anschließend drückt man mit dem Cursor auf dem Menuefeld auf das Feld SCL. Nun erscheint die Skalierungsanzeige. Man aktiviert MAGNIF und gibt den vorher durch entsprechende Bewegung des Spiegelarmes am Mikroskop bei der Eichung eingestellten Faktor ein (siehe 6.2).

Vor der weiteren Aktivierung des Feldes PROG auf dem Menuefeld versichert man sich, daß der Zahlenwert bei MAX CHA nicht größer als 5 ist und alle anderen Zahlenwerte auf der Skalierungsanzeige 1,0 betragen.

Anschließend legt man das Präparat unter das Objektiv 8x/0.18 und führt die Auswertungen auf Kanal 1 durch.

Es empfiehlt sich, die Meßwerte ausdrucken zu lassen (PRT). Sodann speichert man die Meßwerte (STO) auf einer vorher formatierten Diskette. Sehr wichtig ist es, sich vorher die richtigen Identifikationsnummern zu überlegen, um bei der statistischen Auswertung Tiere der gleichen Gruppe zusammenfassen zu können. Ein Beispiel: Es existieren zwei Versuchsgruppen (A, B) zu je zwei Tieren (1, 2). Man wählt nun für A1 die Identifikationsnummer 111111 00 01, für A2 die Nummer 111111 00 02, für B1 die Nummer 222222 00 01, für B2 schließlich 222222 00 02. Nach erfolgter Speicherung löscht man sämtliche Meßwerte.

6.2 EICHUNG DES MIKROSKOPS UND BESTIMMUNG DES VERGRÖßERUNGSFAKTORS

Man legt einen Mikroobjektträger mit Millimeterskala unter das Mikroskop und eine Referenzlänge auf das Meßtablett.

Durch entsprechende Bewegung des Spiegelarmes und entsprechende Beleuchtung kann sowohl 1 mm auf dem Mikroobjektträger unter dem Mikroskop als auch eine Referenzlänge einer Vergleichsskala auf dem Meßtablett zur Deckung gebracht werden (Abb. 11). Ist dies der Fall, dann entspricht der Vergrößerungsfaktor der Referenzlänge in mm (in Abb. 11 also 125).

Der Vergrößerungsfaktor kann nun auf der Skalierungsanzeige unter MAGNIF eingegeben werden. ABER: Aus technisch-praktischen Gründen gibt man nun nicht den Faktor 125, sondern 12,5 ein. Dies bedeutet aber: Bei den auf dem Bildschirm erscheinenden Meßwerten sind Längen mit 10^{-1} , Flächen mit 10^{-2} und Volumina mit 10^{-3} zu multiplizieren, um die Benennungen mm, mm² und mm³ zu erhalten.

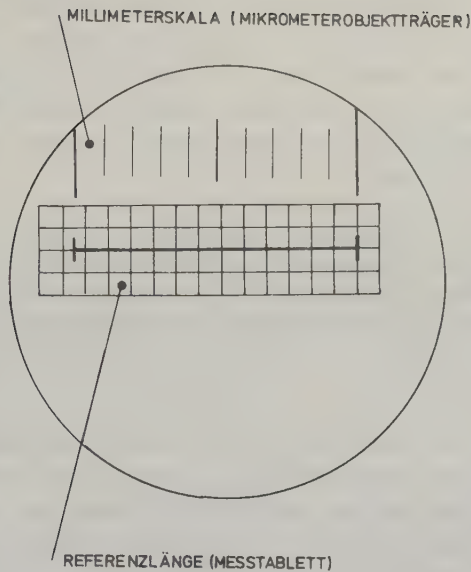


Abb. 11: Eichung des Mikroskops

Durch entsprechende Beleuchtung und entsprechende Bewegung des Spiegelarmes kann 1 mm auf dem Mikroobjektträger und eine entsprechende Referenzlänge auf dem Meßtablett zur Deckung gebracht werden. Der Vergrößerungsfaktor entspricht nun der Referenzlänge in mm.

Nach erfolgter Eichung empfiehlt sich eine Kontrolle. Dies geschieht folgendermaßen: Aktivierung von DISTANCE auf dem Parameterfeld, dann Eingabe des Vergrößerungsfaktors auf der Skalierungsanzeige unter MAGNIF. Entspricht nach Durchführung von 10 Messungen der auf dem Bildschirm angezeigte Wert nicht dem "wahren" Wert auf dem Mikrometerobjektträger, so muß die Eichung wiederholt werden.

6.3 BESTIMMUNG DER GESAMTPRÄPARATEFLÄCHE

Man zeichnet sich die einzelnen Präparateflächen auf ein Blatt Papier und legt dieses zur Umfahrung mit dem Cursor auf das Meßtablett.

Die Auswertung ist im Prinzip wie unter 6.1 beschrieben. Ausnahmen: Auf dem Parameterfeld nur Aktivierung von AREA; auf der Skalierungsanzeige bei MAGNIF Eingabe des Faktors 19 (dies entspricht der durch das Projektionsgerät (Fa. Kontron) entstandenen Vergrößerung).

6.4 BESCHREIBUNG DER ANFERTIGUNG DER HISTOGRAMME DURCH DEN COMPUTER

Man legt die Diskette "Classific" in Drive A und die Diskette mit den gespeicherten Werten in Drive B. Nach Erscheinen der Anzeige A> auf dem Bildschirm drückt man auf die Tasten <C> <L><A><S><S><RETURN>.

Nach Erscheinen der Kommandolisten drückt man, falls die Identifikationsnummer stimmt (MD), auf dem Menuefeld auf PROG .

Bei den Eingabelisten gibt man auf dem Menuefeld ein:

DATAGROUPNR	1
BOTH DATAGROUPS	N
LOGARITHMIC SCALE	N
NR OF CLASSES	Y
XSTEP	25
YSTEP	10

READY? wird mit beantwortet.

Sodann wird auf dem Menuefeld aktiviert. Die Eingaben waren z.B. für die Gruppe H in 3.5:

CHANNELGROUP	-1
PARAMETER	1 (AREA)
NR OF CLASSES	68
SEPARATE FILES	N
LOWER BOUND	1.00
UPPER BOUND	35
ABS FREQUENCY	N
FIXED VERT. SCALE	Y
MAX FREQUENCY	60

Beantwortung der Frage READY? mit . Beantwortung der Frage GAUSSIAN DISTRIBUTION? mit , anschließend . Wird eine kumulative Verteilung gewünscht (Abb. 14), dann kann diese durch Beantwortung der Frage mit ebenfalls dargestellt werden.

SELECTED DATAGROUP

ID.NR. TR SA EXT.1
444400 ?? ?? ?????

CHANNELGROUP -1

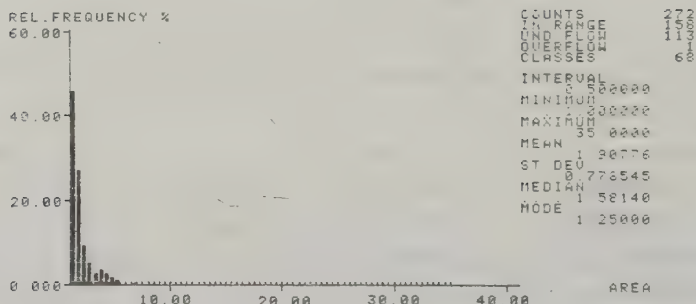


Abb. 12: Computererstelltes Histogramm über die relative Häufigkeit der einzelnen Defektbezirkklassen.

Abszisse: Flächenklassen der Enzymdefektbezirke

Ordinate: Relative Häufigkeit der einzelnen Klassen

Durch entsprechende Wahl der übergeordneten Identifikationsnummer und Eingabe von Fragezeichen für die einzelnen Tiere (444400 ?? ??) können alle Tiere einer Gruppe (hier Gruppe H) dargestellt werden.

Beachte: In diesem Histogrammbeispiel ist ein Wert größer als 35,00 (OVERFLOW 1). Da nur Defektbezirke ab der unteren Größe von 0,01 mm² gewählt werden, erscheint eine entsprechende Zahl von UNDERFLOW in der Statistik.

SELECTED DATAGROUP

ID.NR. TR SA EXT.1
444400 ?? ?? ?????

CHANNELGROUP -1

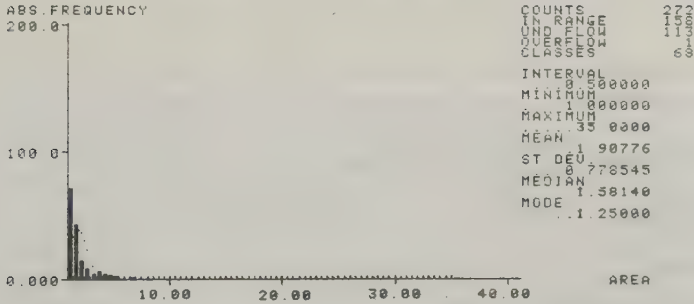


Abb. 13: Absolute Häufigkeit der einzelnen Enzymdefektbezirkklassen.

Die Eingaben unter 4 sind im Text beschrieben. Bei ABS FREQUENCY gibt man Y ein, bei MAX FREQUENCY wird 200 eingegeben.

SELECTED DATAGROUP

ID.NR. TR SA EXT.1
444400 ?? ?? ?????

CHANNELGROUP -1

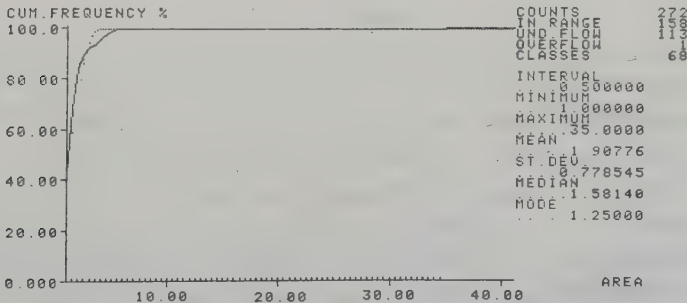


Abb. 14: Kumulatives Häufigkeitshistogramm der einzelnen Defektbezirkklassen.

Abszisse: Flächenklassen der EDB

Ordinate: Kumulative Häufigkeit bei einer bestimmten Flächenklasse

Beachte: Auch in diesem Histogramm sind Werte unter 1 und über 35 (UNDERFLOW, OVERFLOW) nicht berücksichtigt.

6.5 BESCHREIBUNG DER ANFERTIGUNG DES DOPPELKLASSENHISTOGRAMMS DURCH DEN COMPUTER

Das prinzipielle Vorgehen ist wie unter 6.4 beschrieben.
Das Programm läuft unter "Class 2".

Auf der Eingabeliste gibt man ein:

DATAGROUP	1
BOTH DATAGROUPS	N
FULL RANGE	N
DISPLAY COUNTMATRIX	N
LOGARITHMIC X SCALE	Y
LOGARITHMIC Y SCALE	Y
NR OF CLASSES	Y
XPROJECT	145
YPROJECT	100

Dann aktiviert man 4 auf dem Menuefeld und gibt folgende Werte ein:

CHANNELGROUP	-1
PARAMETER	1 (AREA)
LOWER BOUND	1
UPPER BOUND	40
NR OF CLASSES	20
2ND PARAMETER	2 (DMAX)
LOWER BOUND	1
UPPER BOUND	10
NR OF CLASSES	20
MAXIMUM FREQUENCY	40

SELECTED DATAGROUP

ID.NR. TR SA EXT.1
444400 ?? ?? ?????

CHANNELGROUP -1

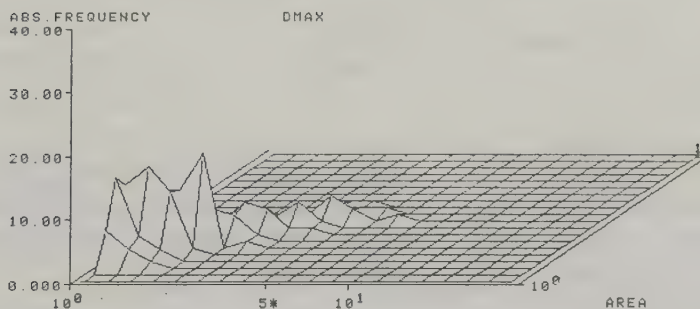


Abb. 15: Doppelklassierungshistogramm (Logarithmischer Maßstab).

x-Achse: Fläche der EDB einer Flächenklasse

Minimum: $0,01 \text{ mm}^2$; Maximum: $0,4 \text{ mm}^2$;

Anzahl der Klassen: 20;

y-Achse: Maximaler Durchmesser der EDB einer bestimmten (maximalen) Durchmesserklasse;

Minimum: $0,1 \text{ mm}$; Maximum: $1,0 \text{ mm}$; Anzahl der Klassen: 20;

z-Achse: Absolute Anzahl der EDB einer bestimmten Flächenklasse und (maximalen) Durchmesserklasse

6.6 STATISTISCHE BERECHNUNGEN MIT HILFE DES COMPUTERSYSTEMS

Zur Durchführung von statistischen Berechnungen ist es notwendig, zuerst mit Hilfe des Programmes "Create File" auf der Diskette "Correction" einzelne Meßwerte auf verschiedenen Kanälen zu speichern, um diese dann mit Hilfe des Statistikprogrammes zu verarbeiten.

Der Speichervorgang ist wie folgt:

Einlegen der Diskette "Corr" in Drive A, Speicherdiskette in Drive B. Drücken der Tasten <C><O><R><R><RETURN>. Sodann auf dem Menuefeld und anschließend aktivieren. Die weiteren Eingaben erfolgen auf dem Keyboard (Tastatur). Eingabe des Parameters (z.B. ANZAHL), dann Drücken von <RETURN>. Eingabe der Kanalnummer, Eingabe der Zahlenwerte, Abschluß durch zweimaliges Drücken von <RETURN>.

Sodann kann die ID-Nr. eingegeben werden. Unter EXTENSION 1, EXTENSION 2 und EXTENSION 3 müssen Fragezeichen (????????...) eingegeben werden.

Die letzte Frage EXTEND? führt zur Umschaltung auf das Meßtablett und ist auf dem Menuefeld mit zu beantworten.

Zur Kontrolle wird empfohlen, und DATALIST sofort anschließend abzurufen.

Die Bedienung des Statistikprogrammes (<S><T><A><T><RETURN>) funktioniert prinzipiell wie oben beschrieben. Unter gebe man ein:

DATAGROUPNR	1
BOTH DATAGROUPS	N
FULL RANGE	N

Nachfolgend sind einige Ergebnisbeispiele für die statistischen Berechnungen aufgeführt (Abb. 16, 17, 18). Die Erläuterungen finden sich bei den einzelnen Abbildungen.

ID.NR. TR SA EXT.1
818192 00 04 ??????

S T A T I S T I C S F O R C H A N N E L S - 1

```

PARAMETER AREA      COUNTS      9  IN RANGE      7
RANGE      MIN 1.000000      - 1000.000      MAX
SUM
13.7866

MEAN      GEOM. MEAN      HARM. MEAN
2.25523      1.88152      1.64679

VARIANCE      SKEWNESS      CURTOSIS
2.59580      1.06206      .625645

STD.DEVIATION      STD.ERROR      AUTOCORRELATION
1.61115      .608957      .349613
  
```

Abb. 16: BASIC STATISTIC (<S>T><A><T><RETURN>; 3)

Die Berechnungen beziehen sich auf ein Tier der Gruppe A. Sämtliche EDB ab einer Größe von 0,01 mm² wurden verrechnet. Da die ausgewertete Präparatefläche dieses Tieres 19,89 cm² betrug, mußte die Anzahl der EDB (= 7) durch 19,89 geteilt werden, um n/cm² zu erhalten (0,352). Der relative Flächenanteil ergab sich aus:

$$\frac{\text{ATPase Defektfläche [cm}^2\text{]} (= 0,0016)}{\text{Präparatefläche [cm}^2\text{]} (= 19,89)} \times 100,$$

also in diesem Fall 0,0079 %. Die mittlere Größe eines EDB dieses Tieres betrug 0,023 mm².

```
T - TEST FOR PARAMETER ANZAHL
-----
STANDARD T-TEST FOR TWO GROUPS :
CHANNELS      COUNTS      MEAN      STD.DEV.
SAMPLE 1:     3          10      39.0600      23.8503
SAMPLE 2:     6          10      6.50900     6.24247

< NOTE : THE TWO SAMPLES SHOW A SIGNIFICANT DIFFERENCE IN VARIANCE
          AT 90.00%-LEVEL. THERE MAY BE A BIAS IN THE FOLLOWING RESULT>

WITH THE PRE-REQUISITE OF GAUSSIAN DISTRIBUTION OF SAMPLES,
NOT TESTED IN THIS CASE , THE FOLLOWING STATEMENT APPLIES :

THERE IS A SIGNIFICANT DIFFERENCE BETWEEN THE TWO MEAN
VALUES AT 95.00%-LEVEL IN TWO-SIDED TEST
(TEST VALUE 4.10 DEGREES OF FREEDOM 10)
IN A ONE-SIDED TEST THE HYPOTHESIS : X1 > X2
MUST BE ASSUMED AT THE 99.90%-LEVEL .

RANGE FOR PARAMETER VALUES IS USER DEFINED
0.00000 - 100000.0
```

Abb. 17: Beispiel für einen (in dieser Arbeit nicht durchgeführten t-Test (<S><T><A><T><2>, 4)

Die Anzahl der EDB/cm² wurde unter einer bestimmten ID-Nr. auf der Diskette "Corr" eingegeben. Verschiedene Tiergruppen wurden unter verschiedenen Kanälen gespeichert (In diesem Fall Kanal 3 für die Tiergruppe C und Kanal 6 für die Tiergruppe F). Die Signifikanz konnte abgelesen werden. Da aber der entsprechende Hinweis erschien (NOTE:...), wurde in dieser Arbeit auf die Verwendung des t-Tests verzichtet.

ID.NR. TR SA EXT.1
121857 00 60 ??????
121857 00 00 ??????

U - T E S T F O R P A R A M E T E R A N Z A H L

	CHANNELS	COUNTS	MEDIAN	INTERQUARTIL RANGE	
SAMPLE 1:	2	9	15.79	8.910	64.64
SAMPLE 2:	6	10	3.660	2.130	12.98

THERE IS A SIGNIFICANT DIFFERENCE BETWEEN THE TWO MEDIANS
AT THE 95.00%-LEVEL IN TWO-SIDED TEST

TEST VALUE	THRESHOLD VALUES WITH COPECTION FOR TIES	
	TWO-SIDED	ONE-SIDED
10.0	24.2	23.3

DATA VALUES ARE ACCEPTED IN FULL RANGE

Abb. 18: U-Test für den Vergleich der Anzahl der EDB/cm² für zwei Versuchstiergruppen (Gruppe B auf Kanal 2, Gruppe F auf Kanal 6).

Auf der Diskette "Stat 2" wurde 3 aktiviert.

7. LITERATURVERZEICHNIS

=====

- ABBOTT, P.J., SAFFHILL, R.: DNA-synthesis with methylated poly (dC-dG) templates. Evidence for a competitive nature to mis-coding by O⁶-methylguanine.
Biochim. Biophys. Acta 562: 51-61; 1979
- AMALDI, F., CARNEVALI, F., LEONI, L., MARIOTTI, D.: Replication origins in chinese hamster cell DNA.
Exp. Cell Res. 74: 367-374; 1972
- BANNASCH, P., MAYER, D., HACKER, H.J.: Hepatocellular glycogenosis and hepatocarcinogenesis.
Biochim. Biophys. Acta 605: 217-245; 1980
- BANNASCH, P., MÜLLER, H.A.: Lichtmikroskopische Untersuchungen über die Wirkung von N-Nitrosomorpholin auf die Leber von Ratte und Maus.
Arzneimittel-Forsch. 14: 805-814; 1964
- BARBASON, H., BETZ, E.H.: Proliferation of Preneoplastic Lesions after Discontinuation of Chronic DEN Feeding in the Development of Hepatoma in Rat.
Br. J. Cancer 44: 561; 1981
- BERENBLUM, I.: Sequential aspects of chemical carcinogenesis: Skin.
In: Becker F.F. (ed.): Cancer: A Comprehensive Treatise, Vol. I, p. 323-344. Plenum Press, New York, 1975
- BERTRAM, J.S., and HEIDELBERGER, C.: Cell cycle dependency of oncogenic transformation induced by N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine in culture.
Cancer Res. 34: 526-537; 1974
- BÖHM, N., MOSER, B.: Reversible Hyperplasie und Hypertrophie der Mäuseleber unter funktioneller Belastung mit Phenobarbital.
Beitr. Path. Bd. 157; 183-300; 1976
- CAMERON, R., KELLEN, J., KOLIN, A., MALKIN, A., FARBER, E.: gamma-Glutamyltransferase in putative premalignant liver cell populations during hepatocarcinogenesis.
Cancer Res. 38: 823-829; 1978
- CERDA-OLMEDO, E., HANAWALT, P.C., GUEROLA, N.: Mutagenesis of the replication point by nitrosoguanidine: map and pattern of replication of the Escherichia coli chromosome.
J. Mol. Biol. 33: 705-719; 1968
- COHEN, S.S., and BARNER, H.D.: Studies on Unbalanced Growth in Escherichia Coli.
Proc. Natl. Acad. Sci. U S 40: 885-893; 1954

- COYLE, M.B., and STRAUSS, B.: Cell Killing and the Accumulation of Breaks in the DNA of HEP-2 Cells Incubated in the Presence of Hydroxyurea.
Cancer Rs. 30: 2314-2319; 1970
- CRADDOCK, V.M.: Liver carcinomas induced in rats by a single administration of dimethylnitrosamine after partial hepatectomy.
J. Natl. Cancer Inst. 47: 889-907; 1971
- CRADDOCK, V.M., and FREI, J.V.: Induction of liver cell adenoma-ta in the rat by a single treatment with N-methyl-N-nitroso-urea given at various times after partial hepatectomy.
Br. J. Cancer 30: 503-511; 1974
- DRUCKREY, H., PREUSSMANN, R., IVANKOVIC, S., und SCHMÄHL, D.: Organotrope carcinogene Wirkungen bei 65 verschiedenen N-Nitroso-Verbindungen an BD-Ratten.
Z. Krebsforschung 66: 1-10; 1964
- DRUCKREY, H., PREUSSMANN, R., SCHMÄHL, D., MÜLLER, M.: Chemi-sche Konstitution und carcinogene Wirkung bei Nitrosaminen.
Naturwissenschaften 48: 134-135; 1961
- DRUCKREY, H., STEINHOFF, D., PREUSSMANN, R., IVANKOVIC, S.: Erzeugung von Krebs durch eine einmalige Dosis von Methyl-nitroso-Harnstoff und verschiedenen Dialkylnitrosaminen an Ratten.
Z. Krebsforsch. 66: 1-10; 1964
- EMMELOT, P., SCHERER, E.: The first relevant cell stage in rat liver carcinogenesis. A quantitative approach.
Biochim. Biophys. Acta 605: 247-304; 1980
- FABRICIUS, E., RAJEWSKY, M.F.: Determination of Hydroxyurea in Mammalian Tissues and Blood.
Rev. Européenne Etudes Clin. Biol. 16: 679-683; 1971
- FARBER, E.: The sequential analysis of liver cancer induction.
Biochim. Biophys. Acta 605: 149-166; 1980
- FARBER, E., PARKER, S., GRUENSTEIN, M.: The Resistance of Putative Premalignant Liver Cell Populations, Hyperplastic Nodules, to the Acute Cytotoxic Effects of Some Hepato-carcinogens.
Cancer Res. 36: 3879-3887; 1976
- FRIEDRICH-FREKSA, H., GÖSSNER, W., BÖRNER, P.: Histochemische Untersuchungen der Cancerogenese in der Rattenleber nach Dauergaben von Diäthylnitrosamin.
Z. Krebsforsch. 72: 226-239; 1969

- FRIDMANN-MANDUZIO, A., GOL-WINKLER, R., BETZ, E.H., and GOUTIER, R.: Tumor Frequency and Characteristics After a Single Dose of Dimethylnitrosamine or Diethylnitrosamine in Partially Hepatectomized Rats.
Z. Krebsforsch. 90: 13-24; 1977
- GERCHMAN, L.L., LUDLUM, D.B.: The properties of O⁶-methylguanine in templates for RNA polymerase.
Biochim. Biophys. Acta 308: 310-316; 1973
- GÖSSNER, W., FRIEDRICH-FREKSA, H.: Histochemische Untersuchungen über die Glucose-6-Phosphatase in der Rattenleber während der Cancerisierung durch Nitrosamine.
Z. Naturforsch. 19b: 862-863; 1964
- GOTH, R., RAJEWSKI, M.F.: Molecular and Cellular Mechanisms Associated with Pulse-Carcinogenesis in the Rat Nervous System by Ethylnitrosourea Ethylation of Nucleic Acids and Elimination Rates of Ethylated Bases from the DNA of Different Tissues.
Z. Krebsforsch. 82: 37-64; 1974
- HANAWALT, P.S., COOPER, P.K., GANESAN, A.K., SMITH, C.A.: DNA-repair in bacteria and mammalian cells.
Annu. Rev. Biochem. 48: 783-836; 1979
- HARRIS, A.L., KARRAN, P., LINDAHL, T.: O⁶-Methylguanine-DNA methyltransferase of human lymphoid cells: Structural and kinetic properties and absence in repair-deficient cells.
Cancer Res. 43: 3247-3252; 1983
- HARTMANN, A.: Zellproliferation und Cancerogenese. Untersuchungen an der Rattenleber nach zweimaliger Hepatektomie und Zellsynchronisation durch Hydroxyharnstoff.
Dissertation München 1981
- HARTMANN, A., RABES, H.M.: Die Entstehung praeneoplastischer Läsionen in der Rattenleber nach zweimaliger Karzinogenexposition in spezifischen Phasen des Zellzyklus.
Verh. Dtsch. Ges. Path. 66: 503; 1982
- HEISTERKAMP, N., GROFFEN, J., STEPHENSON, J.R., SPURR, N.K., GOODFELLOW, P.N., SOLOMON, E., CARRITT, B., BODMER, W.F.: Chromosomal localization of human cellular homologues of two viral oncogenes.
Nature 299: 747-749; 1982
- HENSON, P.: The Presence of Single Stranded Regions in Mammalian DNA.
J. Mol. Biol. 119: 487-506; 1978

- HIGGINS, G.M., ANDERSON, R.M.: Experimental pathology of the liver; restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal.
Arch. Pathol. 12: 186-202; 1931
- HUANG, P., STEWART, B.: Dimethylnitrosamine-induced structural damage to DNA results from repair of O⁶-methylguanine rather than repair of 7-methylguanine.
Cancer Letters 5: 161-166; 1978
- ISELER, G.: Untersuchungen zur Synchronisation der DNA-Synthese in der regenerierenden Rattenleber nach Hydroxyharnstoff-Dauerbehandlung.
Diss. LMU München, 1977
- JONES, P.A., BENEDICT, W.F., BAKER, M.S., MONDAL, S., RAPP, U., HEIDELBERGER, C.: Oncogenic transformation of C 3 H 10T1/2 clone 8 mouse embryo cells by halogenated pyrimidine nucleosides.
Cancer Res. 36: 101-107; 1976
- KAUFMANN, W.K.: Studies of the Susceptibility of Hepatocytes in Specific Cell-Cycle States to Carcinogenesis by N-Methyl-N-Nitrosourea.
Diss. Abstr. Int. (B); 40(5): 2132; University North Carolina; 1979
- KIRTIKAR, D.M., GOLDTHWAIT, D.A.: The enzymatic release of O⁶-methylguanine and 3-methyladenine from DNA reacted with the carcinogen N-methyl-N-nitrosourea.
Proc. Nat. Acad. Sci. 71: 2022-2026; 1974
- KITAGAWA, T.: Sequential Phenotypic Changes in Hyperplastic Areas During Hepatocarcinogenesis in the Rat.
Cancer Res. 36: 2534-2539; 1976
- KITAGAWA, T., and PITOT, H.C.: The Regulation of Serine Dehydratase and Glucose-6-phosphatase in Hyperplastic Nodules of Rat Liver During Diethylnitrosamine and N-2-Fluorenylaceta-mide Feeding.
Cancer Res. 35: 1075-1084; 1975
- KITAGAWA, T., PITOT, H.G., MILLER, E.C., and MILLER, A.: Promotion by dietary phenobarbital of hepatocarcinogenesis by 2-methyl-N, N-dimethyl-4-amino-azobenzene in the rat.
Cancer Res. 39: 112-115; 1979
- KITAGAWA, T., SUGANO, H.: Enhancing Effect of Phenobarbital on the Development of Enzyme Altered Islands and Hepato-cellular Carcinomas Initiated by 3-Methyl-4-(Dimethyl-amino)Azobenzene or Diethylnitrosamine.
Gann, 69: 679-687; 1978

- KLEIHUES, P., BAMBORSCHKE, S., DOERJER, G.: Persistence of alkylated DNA bases in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*) following a single dose of methylnitrosourea. *Carcinogenesis* 1: 111-113; 1980
- KLEIHUES, R., MARGISON, G.P.: Carcinogenicity of N-methyl-N-nitrosourea: possible role of excision repair of O⁶-methyl-guanine from DNA. *J. Natl. Cancer Inst.* 53: 1839-1841; 1974
- KLINGE, O., MATHYL, J.: Tageszeitliche Mitose-Rhythmen in der teilektomierten Rattenleber. *Virchows Arch. Abt. B. Zellpath.* 2: 154-162; 1969
- KOEN, H., PUGH, T.D., NYCHKA, D., GOLDFARB, S.: Presence of alpha-Fetoprotein-positive Cells in Hepatocellular Foci and Microcarcinomas Induced by Single Injections of Diethylnitrosamine in Infant Mice. *Cancer Res.* 43: 702-708; 1983
- LAISHES, B.A., ROBERTS, E., FARBER, E.: In-vitro measurement of carcinogen-resistant liver cells during hepatocarcinogenesis. *Int. J. Cancer* 21: 186-193; 1978
- LEWIN, B.M.: Gene expression 2. Second Edition: Eucaryotic Chromosomes; John Wiley & Sons; 1980
- LEWIS, J.G., SWENBERG, J.A.: Differential repair of O⁶-methyl-guanine in DNA of rat hepatocytes and nonparenchymal cells. *Nature* 288: 185-187; 1980
- LEWIS, J.G., SWENBERG, J.A.: Effect of 1,2-Dimethylhydrazine and Diethylnitrosamine on Cell Replication and Unscheduled DNA Synthesis in Target and Nontarget Cell Populations in Rat Liver Following Chronic Administration. *Cancer Res.* 42: 89-92; 1982
- LIJINSKY, W., LOO, J., ROSS, A.E.: Mechanism of Alkylation of Nucleic Acids by Nitrosodimethylamine. *Nature* 223: 206-207; 1969
- LIKHACHEV, A.J., IVANOV, M.N., BRESIL, H., PLANCHE-MARTEL, G., MONTESANO, R., MARGISON, G.P.: Carcinogenicity of Single Doses of N-Nitroso-N-methylurea and N-Nitroso-N-ethylurea in Syrian Golden Hamsters and the Persistence of Alkylated Purines in the DNA of Various Tissues. *Cancer Res.* 43: 829-833; 1983
- LLOYD, D., POOLE, R.K.: The Cell Division Cycle: Academic Press 1982

- LOVELESS, A.: Possible relevance of O⁶-alkylation of deoxyguanosine to the mutagenicity and carcinogenicity of nitrosamines and nitrosamides.
Nature 223: 206-207; 1969
- MAGEE, P.N., PEGG, A.E., SWANN, P.F.: Molecular mechanisms of chemical carcinogenesis.
In: Handb. Allg. Path., Band 6, Geschwülste, II/6,
p. 329-419. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg; 1975
- MEHTA, J.R., LUDLUM, D.B.: Synthesis and properties of O⁶-methyldeoxyguanylic acid and its copolymers with deoxycytidylic acid.
Biochim. Biophys. Acta 521: 770-778; 1978
- MILLER, E.C., and MILLER, J.A.: Biochemical mechanism of chemical carcinogenesis.
In: H. Busch (ed.) The molecular biology of cancer,
pp. 377-402. New York Academic Press Inc.; 1974
- MORAN, R., STRAUS, M.J.: Cytokinetic Analysis of L1210 Leukemia After Continuous Infusion of Hydroxyurea in-vivo.
Cancer Res. 39: 1616-1622; 1979
- MÜLLER, L., and RABES, H.M.: Cell cycle dependent initiation of ATPase deficient preneoplastic cell populations in regenerating rat liver.
J. Cancer Res. Clin. Oncol. 105, No. 2; 1983
- NAGATA, C., TAKEDA, E., AIDA, M.: Why O⁶-alkylguanine is specifically promutagenic? A initio molecular orbital consideration.
Mutation Research 105: 1-8; 1982
- OCKEY, C.H., ALLEN, T.D.: Distribution of DNA or DNA Synthesis in Mammalian Cells Following Inhibition with Hydroxyurea and 5-Fluorodeoxyuridine.
Exptl. Cell Res. 93: 275-282; 1975
- OEHLERT, W., HÄMMERLING, W., BÜCHNER, F.: Der zeitliche Ablauf und das Ausmaß der DNA-Synthese in der regenerierenden Leber der Ratte nach Teilhepatektomie.
Beitr. path. Anat. 126: 91-112; 1962
- OGAWA, K., SOLT, D.B., FARBER, E.: Phenotypic Diversity as an Early Property of Putative Preneoplastic Hepatocyte Populations in Liver Carcinogenesis.
Cancer Res. 40: 725-733; 1980
- PEGG, A.E.: Enzymatic Removal of O⁶-Methylguanine from DNA by Mammalian Cell Extracts.
Biochem. and Biophys. Res. Comm. 84, No. 1: 166-173; 1978

- PEGG, A.E., PERRY, W., BENNETT, R.A.: Effect of partial hepatectomy on removal of O⁶-methylguanine from alkylated DNA by rat liver extracts.
Biochem. J. 197: 195-201; 1981
- PEGG, A.E., ROBERFROID, M., BAHR, C.V., FOOTE, R.S., MITRA, S., BRESIL, H., LIKHACHEV, A., MONTESANO, R.: Removal of O⁶-methylguanine from DNA by human liver fractions.
Proc. Natl. Acad. Sci. 79: 5162-5165; 1982
- PEGG, A.E., WIEST, L., FOOTE, R., MITRA, S., PERRY, W.: Purification and Properties of O⁶-Methylguanine-DNA Transmethylase from Rat Liver.
J. Biol. Chem. 258: 2327-2333; 1983
- PERAINO, C., FRY, J.M., STAFFELDT, E.: Reduction and Enhancement by Phenobarbital of Hepatocarcinogenesis Induced in the Rat by 2-Acetylaminofluorene.
Cancer Res. 31: 1506-1512; 1971
- PERAINO, C., FRY, J.M., STAFFELDT, E.: Effects of Varying the Onset and Duration of Exposure to Phenobarbital on its Enhancement of 2-AAF-induced Hepatic Tumorigenesis.
Cancer Res. 37: 3623-3627; 1977
- PERAINO, C., FRY, R.J.M., STAFFELDT, E., KISIELESKI, W.E.: Effects of varying the exposure to phenobarbital on its enhancement of 2-acetylaminofluorene-induced hepatic tumorigenesis in the rat.
Cancer Res. 33: 2701-2705; 1973
- PERLMAN, D., ROWND, R.H.: Accumulation of replicating bacterial plasmid DNA during thymine limitation or hydroxyurea treatment.
Molec. gen. Genet. 138: 282-291; 1975
- PHILIPS, F.S., STERNBERG, S.S., SCHWARTZ, H.S., CRONIN, A.P., SODERGREN, J.E., VIDAL, P.M.: Hydroxyurea: I. Acute Cell Death in Proliferating Tissues in Rats.
Cancer Res. 27: 61-74; 1967
- PITOT, H.G., BARSNESS, L., GOLDSWORTHY, T., KITAGAWA, T.: Biochemical characterization of stages of hepatocarcinogenesis after a single dose of diethylnitrosamine.
Nature 271: 456-458; 1978
- PITOT, H.C., SIRICA, A.E.: The stages of initiation and promotion in hepatocarcinogenesis.
Biochim. Biophys. Acta 605: 191-215; 1980

- PUGH, T.D., GOLDFARB, S.: Quantitative histochemical and autoradiographic studies of hepatocarcinogenesis in rats fed 2-acetylaminofluorene followed by phenobarbital. *Cancer Res.* 38: 4450-4457; 1978
- PUGH, T.D., KING, J.H., KOEN, H., NYCHKA, D., CHOVER, J., WAHBA, G., HE, Y., GOLDFARB, S.: Reliable Stereological Method for Estimating the Number of Microscopic Hepatocellular Foci from Their Transections. *Cancer Res.* 43: 1261-1268; 1983
- RABES, H.M.: Bestimmung der Zellzyklusphasen in heterogenen Tumorzellpopulationen in-vivo. *Zschr. Naturforsch.* 24b: 468; 1969
- RABES, H.M.: Kinetics of hepatocellular proliferation after partial resection of the liver. In: H. Popper and F. Schaffner (eds.) *Progress in Liver Diseases*, Vol. V p. 83-89. Grune and Stratton, New York, San Francisco, London; 1976
- RABES, H.M.: Proliferative Vorgänge während der Frühstadien der malignen Transformation. *Verh. Dtsch. Ges. Path.* 63: 18-39; 1979
- RABES, H.M.: Development and growth of early preneoplastic lesions during chemical carcinogenesis in the liver. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 1-8; 1983
- RABES, H.M., and BRÄNDLE, H.: Synthesis of RNA, Protein and DNA in the liver of normal and hypophysectomized rats after partial hepatectomy. *Cancer Res.* 29: 817-822; 1969
- RABES, H.M., BÜCHER, T.H., HARTMANN, A., LINKE, J., DÜNNWALD, M.: Clonal growth of carcinogen-induced enzyme-deficient preneoplastic cell populations in mouse liver. *Cancer Res.* 42: 3220-3227; 1982 a
- RABES, H.M., HARTENSTEIN, R., SCHOLZE, P.: Specific stages of cellular response to homeostatic control during diethylnitrosamine-induced liver carcinogenesis. *Experientia* 26: 1356-1359; 1970
- RABES, H.M., ISELER, G., CZICHOS, S., TUCZEK, H.V.: Synchronisation of hepatocellular DNA synthesis in regenerating rat liver by continuous infusion of hydroxyurea. *Cancer Res.* 37: 1105-1111; 1977

- RABES, H.M., KERLER, R., RODE, G., SCHUSTER, C., WILHELM, R.:
O⁶-Methylguanine Repair in Liver Cells in-vivo: Comparison
between G₁ and S-Phase of the Cell Cycle.
J. Cancer Res. Clin. Oncol. 108: 36-45; 1984
- RABES, H.M., KERLER, R., WILHELM, R.: DNA Alkylation and Tumor
Induction in Regenerating Rat Liver After Cell Cycle-
Related Continuous N-Nitrosodimethylamine Infusion.
JNCI, 70: 193-198; 1983
- RABES, H.M., SCHOLZE, P., JANTSCH, B.: Growth kinetics of
diethylnitrosamine-induced, enzyme-deficient "preneoplastic"
liver cell populations in vivo and in vitro.
Cancer Res. 32: 2577-2586; 1972
- RABES, H.M., and SZYMKOWIAK, R.: Cell Kinetics of Hepatocytes
During the Preneoplastic Period of Diethylnitrosamine-
induced Liver Carcinogenesis.
Cancer Res. 39: 1298-1304; 1979
- RABES, H.M., und TUCZEK, H.V.: Quantitative autoradiographische
Untersuchung zur Heterogenität der Leberzellproliferation
nach partieller Hepatektomie.
Virch. Arch. Abt. B. Zellpath. 6: 302-312; 1970
- RABES, H.M., WILHELM, R., KERLER, R., RODE, G.: Dose- and cell
cycle-dependent O⁶-methylguanine elimination from DNA in
regenerating rat liver after (¹⁴C)dimethylnitrosamine
injection.
Cancer Res. 42: 3814-3821; 1982 b
- RABES, H.M., WIRSCHING, R., TUCZEK, H.V., ISELER, G.: Analysis
of Cell Cycle Compartments of Hepatocytes After Partial
Hepatectomy.
Cell Tissue Kinet. 9: 517-532; 1976
- RAJEWSKY, M.F.: Synchronisation in-vivo: Kinetics of a malignant
cell system following temporary inhibition of DNA synthesis
with hydroxyurea.
Exptl. Cell Res. 60: 269-276; 1970
- RAJEWSKY, M.F.: Proliferative parameters of mammalian cell
systems and their role in tumor growth and carcinogenesis.
Z. Krebsforsch. 78: 12-30; 1972
- REDDY, E.P., REYNOLDS, R.K., SANTOS, E., BARBACID, M.: A point
mutation is responsible for the acquisition of transforming
properties by the T24 human bladder carcinoma oncogene.
Nature 300: 149-152; 1982

- RIESS, H.B.: Untersuchungen zur Proliferation und Cancerogenese an der Hydroxyharnstoff-synchronisierten teilresezierten Rattenleber.
Diss. München; 1978
- ROBERTS, E., AHLUWALIA, M.B., LEE, G., CHAN, C., SARMA, D.S.R., FARBER, E.: Resistance to Hepatotoxins Acquired by Hepatocytes During Liver Regeneration.
Cancer Res. 43: 28-34; 1983
- RUECKERT, R.R., MUELLER, G.C.: Studies on Unbalanced Growth in Tissue Culture. I. Induction and Consequences of Thymidine Deficiency.
Cancer Res. 20: 1584-1591; 1960
- SCHAUER, A., und KUNZE, E.: Enzymhistochemische und autoradiographische Untersuchungen während der Cancerisierung der Rattenleber mit Diäthylnitrosamin.
Z. Krebsforsch. 70: 252-266; 1968
- SCHERER, E., and EMMELOT, P.: Kinetics of induction and growth of precancerous liver-cell foci and liver tumor formation by diethyl-nitrosamine in the rat.
Europ. J. Cancer 11: 689-696; 1975
- SCHERER, E., and EMMELOT, P.: Kinetics of induction and growth of enzyme-deficient islands involved in hepatocarcinogenesis.
Cancer Res. 36: 2544-2554; 1976
- SCHERER, E., and HOFFMANN, M.: Probable Clonal Genesis of Cellular Islands Induced in Rat Liver by Diethylnitrosamine.
Europ. J. Cancer 7: 369-371; 1971
- SCHERER, E., HOFFMANN, M., EMMELOT, P., FRIEDRICH-FREKSA, M.: Quantitative Study on Foci of Altered Liver Cells Induced in the Rat by a Single Dose of Diethylnitrosamine and Partial Hepatectomy.
J. Natl. Cancer Inst. 49: 93-106; 1972
- SCHIEFERSTEIN, G., PIRSCHEL, J., FRANK, W., und FRIEDRICH-FREKSA, H.: Quantitative Untersuchungen über den irreversiblen Verlust zweier Enzymaktivitäten in der Rattenleber nach Verfütterung von Diäthylnitrosamin.
Z. Krebsforsch. 82: 191-208; 1974
- SCHMIDKONZ, P.: Stereologisch-Morphometrische Untersuchungen an der regenerierenden Rattenleber nach Hydroxyharnstoff-Dauerbehandlung.
Diss. LMU München 1979

- SCHOLZE, P.: Proliferation und Histochemische Enzymaktivität normaler und präneoplastischer Zellpopulationen in der Leber während der Diäthylnitrosamininduzierten Carcinogenese. Diss. LMU München 1972
- SCHULTE-HERMANN, R., OHDE, G., SCHUPPLER, J.: Proliferation präneoplastischer Leberzellen unter dem Einfluß von Wachstumsreizen.
63 Verh. Dtsch. Ges. Pathol.: 468-472; 1979
- SCHULTE-HERMANN, R., OHDE, G., SCHUPPLER, J., TIMMERMANNTROSIENER, J.: Enhanced proliferation of putative preneoplastic cells in rat liver following treatment with the tumor promoters phenobarbital, hexachlorocyclohexane, steroid compounds, and nafenopin.
Cancer Res. 41: 2556-2562; 1981
- SINGER, B.: Guest editorial: N-nitroso-alkylating agents: Formation and persistence of alkyl derivatives in mammalian nucleic acids as contributing factors in carcinogenesis.
JNCI 62: 1329-1339; 1979
- SNEIDER, T.W.: DNA: Replication, Modification and Repair. In: The Molecular Biology of Cancer. pp. 111-186. Harris Busch (ed.); Academic Press New York and London 1974
- SOLT, D.B., CAYAMA, E., TSUDA, H., ENOMOLO, K., LEE, G., FARBER, E.: Promotion of Liver Cancer Development by Brief Exposure to Dietary 2-Acetylaminofluorene plus Partial Hepatectomy or Carbon Tetrachloride.
Cancer Res. 43: 188-191; 1983
- SOLT, D., FARBER, E.: New principle for the analysis of chemical carcinogenesis.
Nature 263: 701-703; 1976
- STUMPF, R., MARGISON, G.P., MONTESANO, R., PEGG, A.E.: Formation and Loss of Alkylated Purines from DNA of Hamster Liver After Administration of Dimethylnitrosamine.
Cancer Res. 39: 50-54; 1979
- SWANN, P.F., MAGEE, P.N.: Nitrosamine-induced carcinogenesis. The alkylation of nucleic acids of the rat by N-methyl-N-nitrosourea, dimethylnitrosamine, dimethyl sulphate and methyl methanesulphonate.
Biochem. J. 110: 39-47; 1968
- TABIN, C.J., BRADLEY, S.M., BARGMANN, C.I., WEINBERG, R.A., PAPAGEORGE, A.G., SCOLNICK, E.M., DHAR, R., LOWY, D.R., CHANG, E.H.: Mechanism of activation of a human oncogene.
Nature 300: 143-149; 1982

- TAPER, H.S., FORT, L., BRUCHER, J.M.: Histochemical Activity of Alkaline and Acid Nucleases in the Rat Liver Parenchyma During N-Nitrosomorpholine Carcinogenesis. *Cancer Res.* 31: 913-916; 1971
- TUCZEK, H.V., SKORUPPA, W., RABES, H.M.: Zellkinetische Untersuchungen zur Interferenz zwischen Proliferations- und Funktionsstoffwechsel in der regenerierenden Rattenleber nach Applikation von Phenobarbital. *Virchows Arch. B Cell Path.* 17: 347-361; 1975
- WACHSTEIN, M., and MEISEL, E.: Histochemistry of hepatic phosphatases at a physiological pH with a special reference to the demonstration of bile canaliculi. *Am. J. Clin. Pathol.* 27: 13-23; 1957
- WALTERS, R.A., TOBEY, R.A., and RATLIFF, R.L.: Cell-cycle dependent variations of deoxyribonucleoside triphosphate pools in chinese hamster cells. *Biochim. Biophys. Acta* 319: 336-347; 1973
- WARREN, W., LAWLEY, P.D.: The removal of alkylation products from the DNA of Escherichia coli cells treated with the carcinogens N-ethyl-N-nitrosourea and N-methyl-N-nitrosourea: influence of growth conditions and DNA repair defects. *Carcinogenesis* 1: 67-78; 1980
- WARWICK, G.P.: Effects of the cell cycle on carcinogenesis. *Federation Proc.* 30: 1760-1765; 1971
- WATANABE, K., and WILLIAMS, G.M.: Enhancement of rat hepatocellular-altered foci by the liver tumor promoter phenobarbital: Evidence that foci are precursors of neoplasms and that the promoter acts on carcinogen-induced lesions. *J. Natl. Cancer Inst.* 61: 1311-1314; 1978
- WILLIAMS, G.M.: The pathogenesis of rat liver cancer caused by chemical carcinogens. *Biochim. Biophys. Acta* 605: 167-189; 1980
- WILLIAMS, G.M., YAMAMOTO, R.S.: Absence of stainable iron from preneoplastic and neoplastic lesions in rat liver with 8-hydroxyquinoline-induced siderosis. *J. Natl. Cancer Inst.* 49: 685-692; 1972
- WIRSCHING, R.: Quantitative Autoradiographische Untersuchung zur Kinetik der Leberzellproliferation nach partieller Hepatektomie. Dissertation der Medizinischen Fakultät der Universität München; 1974

L E B E N S L A U F

=====

Name: Ludwig Müller

Geburtsdatum: 12.10.1957

Geburtsort: Malgersdorf

Familienstand: ledig

Schulausbildung: 1964 - 1968 Hauptschule Malgersdorf
1968 - 1974 Humanistisches Gymnasium
Schweiklberg
1974 - 1977 Humanistisches Gymnasium
Leopoldinum Passau

Studium: Seit dem WS 77/78 an der Ludwig-Maximilians-
Universität München;
im SS 82 eine Famulatur am John Radcliffe
Hospital, University of Oxford; Förderung
nach dem Bayerischen Begabtenförderungsgesetz
und durch die Studienstiftung des Deutschen
Volkes

Praktisches Jahr: Chirurgische Klinik und Poliklinik
Innenstadt;
Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und
Ohrenkranke Großhadern;
Medizinische Klinik III; Großhadern

Approbation: 18.5.1984

Wehrdienst: 1.7. - 30.9.1977 und seit
1.8.1984

